

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA EL
AISLAMIENTO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN TEJIDOS BOVINOS**

POR

JOEL DELGADILLO MEDRANO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

MAYO, 2017

**EVALUACIÓN DE TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA EL
AISLAMIENTO DE *Mycobacterium bovis* EN TEJIDOS BOVINOS**

Comité de Tesis

Dra. María Porfiria Barrón González

Director de Tesis

Dr. José Santos García Alvarado

Secretario

Dra. Diana Reséndez Pérez

Vocal 1

Dra. Licet Villareal Treviño

Vocal 2

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Vocal 3

Mayo, 2017

**EVALUACIÓN DE TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA EL
AISLAMIENTO DE *Mycobacterium bovis* EN TEJIDOS BOVINOS**

Dirección de Tesis

Dra. María Porfiria Barrón González
Director de Tesis

Dr. Alberto Morales Loredó
Director Externo

Mayo, 2017

**EVALUACIÓN DE TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA EL
AISLAMIENTO DE *Mycobacterium bovis* EN TEJIDOS BOVINOS**

Dirección de Tesis

Dra. María Porfiria Barrón González
Director de Tesis

Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo
Asesor Externo

Mayo, 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a la Dra. María Porfiria Barrón González y el Dr. Alberto Morales Loredo por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo de investigación, así como por su ejemplo de disciplina y arduo trabajo.

Ofrezco mis más sinceros agradecimientos a quienes me hicieron posible la realización de esta investigación:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindar los recursos necesarios para mi formación.

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindar las facilidades para mi formación como profesional.

Comité de tesis, por su labor en la mejora de este trabajo y el apoyo brindado.

Laboratorio Central Regional de Monterrey, por brindar el espacio físico en el cual se llevo a cabo la investigación.

Familia Botello Hernández, Dolores García, Elvia Silva, Raymundo Colorado, Martha Silva y Patricia Flores, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

DEDICATORIAS

A Joel y Esperanza

Por brindarme la fuerza para seguir adelante aunque las circunstancias no sean las más favorables y hacerme saber que con la ayuda de Dios todo es posible.

A Maribel y Nelly

Por hacer esta vida más fácil y divertida, un cordón de 3 dobleces no se rompe fácilmente

A mis Amigos

Moisés, Mara, Celiz, Said, Limna, Lizbeth, por hacerme sentir amado e importante.

A Jaime

Por alentarme siempre a confiar en mi capacidad y dar lo mejor de mí mismo aunque sienta que no puedo.

A mis Alumnos

Por enseñarme mucho más de lo que yo podría enseñarles a ustedes

A DIOS

“El deber de un hombre está ahí, donde es más útil.”

-José Martí

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
2.1 Importancia de <i>Mycobacterium bovis</i>	3
2.2 Diagnóstico de tuberculosis bovina.....	3
2.3 Diagnóstico de tuberculosis bovina en México.....	4
2.4 Diagnóstico acorde a la NOM-031-ZOO-1995.....	5
2.5 Técnicas distintas a las establecidas en la NOM.....	6
2.6 Descontaminantes.....	6
2.7 Medios de cultivo.....	6
2.8 Separación inmunomagnética.....	7
2.9 Microscopía de fuerza atómica.....	8
3.- JUSTIFICACIÓN.....	11
4.- HIPÓTESIS.....	12
5.- OBJETIVOS.....	12
5.1 Objetivo General.....	12
5.2 Objetivos particulares.....	12
6. METODOLOGÍA.....	13
6.1 Material biológico.....	13
6.2 Histopatología.....	13
6.3 Medios de cultivo.....	15
6.4 Aislamiento bacteriano.....	16
6.5 Lavado y descontaminación.....	16
6.5.1 Método de Petroff.....	16
6.5.2 Método Petroff/USDA.....	17
6.5.3 Descontaminación con agentes distintos.. ..	18
6.6 Separación inmunomagnética.....	19
6.7 Prueba de PCR.....	20
6.8 Análisis morfométrico de <i>M. bovis</i> aislada con diferentes tratamientos.....	21
6.8.1 Modos básicos de operación.....	22
6.9 Análisis estadístico.....	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Cultivo e histopatología.....	25
7.2 Estandarización de la técnica de separación inmunomagnética (IMS) y detección por PCR de <i>M. bovis</i> a partir de suspensiones bacterianas.....	27
7.3 Análisis de <i>M. bovis</i> a microscopía de fuerza atómica.....	28

a) <i>M. bovis</i> control.....	28
b) <i>M. bovis</i> descontaminada.....	31
c) <i>M. bovis</i> obtenida por separación inmunomagnética.....	33
7.4 Correlación de identificación de micobacterias por técnica	
histopatológica y aislamiento bacteriano	36
7.5 Descontaminantes distintos al NaOH.....	37
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	42
10. PRESPECTIVAS.....	43
11. BIBLIOGRAFÍA.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1- Aspecto de un granuloma típico de <i>M. bovis</i> en tejido.....	25
Fig. 2- Aspecto de <i>M. bovis</i> teñido con la técnica de Zihel-Neelsen.....	26
Fig. 3- Relación de resultados obtenidos mediante el método de Petroff de la prueba de histopatología y aislamiento	26
Fig. 4- Relación de resultados obtenidos de la prueba de histopatología y aislamiento mediante el método de Petroff/USDA	27
Fig. 5- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la cepa de referencia.....	28
Fig. 6- Aspecto topológico de <i>M.bovis</i> control al MFA.....	29
Fig. 7- Análisis de <i>M. bovis</i> control al MFA.....	30
Fig. 8- Análisis al MFA de <i>M. bovis</i> descontaminada según NOM.....	31
Fig. 9- Determinación de la altura de la célula de <i>M. bovis</i> descontaminada de acuerdo a la NOM.....	32
Fig. 10- Acercamiento de la célula de <i>M. bovis</i> descontaminada de acuerdo a la NOM.....	32
Fig. 11- Célula de <i>M. bovis</i> sometida a IMS.....	33
Fig. 12- Análisis de fases al AFM de <i>M. bovis</i> obtenida por IMS.....	33

Fig. 13- Determinación de la altura de la célula de <i>bovis</i> sometida a IMS.....	34
Fig. 14- Comparación de parámetros morfométricos de <i>M. bovis</i>	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1- Procedimiento de tinción de tejidos con hematoxilina y eosina.....	14
Tabla 2- Procedimiento de tinción de tejidos con Zihel-Neelsen.....	15
Tabla 3- Reactivos y concentraciones utilizados para PCR punto final.....	21
Tabla 4- Temperaturas, tiempos y ciclos para la PCR punto final.....	21
Tabla 5- Identificación bioquímica de <i>M. bovis</i>	25
Tabla 6- Comparación de parámetros morfométricos de <i>M. bovis</i> con diversos tratamientos.....	35
Tabla 7- Correlación entre histopatología y aislamiento bacteriano en los años 2015 y 2016.....	36
Tabla 8- Análisis global de muestras procesadas en 2015 por el método de Petroff-NOM.....	37
Tabla 9- Análisis global de muestras procesadas en 2016 por el método de Petroff-USDA.....	38

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AFM	Atomic force microscopy
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
IMS	Inmunomagnetic separation
LW	Lowenstein-Jensen
MA	Micobacterias atípicas
mL	Mililitros
NaOH	Hidroxido de sodio
NOM	NOM-ZOO-056-1995
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revoluciones por minuto
ST	Stonebrink
TB	Tuberculosis

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infectocontagiosa crónica causada por especies del género *Mycobacterium*, afecta a bovinos y un amplio rango de animales domésticos y salvajes. El humano puede contraerla al consumir productos lácteos contaminados, no pasteurizados o por el contacto directo con animales enfermos. La prevalencia tuberculosis bovina en México depende de los trabajos de control y erradicación de cada estado de la República. Los Estados de la República Mexicana que incrementan su prevalencia por reportes de animales positivos en USA, corren el riesgo de perder el reconocimiento para exportación, por lo cual el control y diagnóstico de la tuberculosis es fundamental para mantener la prevalencia baja. Por lo que este trabajo tiene la finalidad de evaluar técnicas bacteriológicas para aumentar el porcentaje de aislamientos con respecto al número de muestras compatibles a tuberculosis por histopatología. Se trabajó con muestras de tejido de animales remitidos al laboratorio central regional del norte para su análisis de tuberculosis. Las muestras se clasificaron de acuerdo a la presencia o ausencia de lesiones compatibles con tuberculosis bovina a la histopatología y el resultado de aislamiento bacteriológico. Se procesaron 105 muestras con el método de descontaminación tradicional de Petroff y se obtuvo aislamiento de *M. bovis* en el 30.7% de las muestras compatibles a tuberculosis por histopatología y un 7.6% de micobacterias atípicas. Un segundo grupo de 105 muestras fue procesado por el método de descontaminación modificado Petroff/USDA y se obtuvo un porcentaje de aislamiento de *M. bovis* respecto a las muestras compatibles por histopatología de 32.4% con un 44.1% de micobacterias atípicas. Al analizarse las muestras por microscopia de fuerza atómica se observó deformidades y cortes en la pared celular de los bacilos descontaminados con NaOH 2N, el método de descontaminación utilizado es de suma importancia puesto que afecta directamente en los cultivos al restar viabilidad a los bacilos presentes en las muestras.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TB) is a chronic infectious contagious disease caused by species of the genus *Mycobacterium*, Affects cattle and a wide range of domestic and wild animals. The human can contract it by consuming contaminated, unpasteurized dairy products or by direct contact with diseased animals. The prevalence of bovine tuberculosis in Mexico depends on the control and eradication work of each state of the Republic. The States of the Mexican Republic that increase their prevalence by reports of positive animals in the USA, run the risk of losing the recognition for export, so the control and diagnosis of tuberculosis is essential to keep the prevalence low. Therefore, this work has the purpose of evaluating bacteriological techniques to increase the percentage of isolates with respect to the number of samples compatible to tuberculosis by histopathology. We worked with animal tissue samples sent to the northern regional central laboratory for tuberculosis analysis. Samples will be classified according to the presence or absence of lesions compatible with bovine tuberculosis to the histopathology and the result of bacteriological isolation. 105 samples were processed using Petroff's traditional decontamination method and isolation of *M. bovis* was obtained in 30.7% of the samples compatible with tuberculosis by histopathology and 7.6% of atypical mycobacteria. A second set of 105 samples was processed by the modified Petroff / USDA decontamination method and a percentage of *M. bovis* isolation was obtained from the compatible samples by histopathology of 32.4% with 44.1% of atypical mycobacteria. When analyzing the samples by atomic force microscopy, deformities and cuts were observed in the cell wall of the bacilli decontaminated with 2N NaOH. The method of decontamination used is extremely important since it directly affects the cultures by rendering viability to the bacilli present in the samples.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* está catalogado en el phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Actinomycetales, suborden Corynebacterineae, familia Mycobacteriaceae. Este género comprende más de 120 especies y se encuentran descritas bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y los animales. Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y son ácido-alcohol resistentes. Esta última propiedad se debe al elevado contenido de lípidos en su pared celular, entre los que se incluyen los ácidos micólicos.

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) se caracteriza por causar tuberculosis en humanos y animales e incluye varias especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. canetti*. Todas ellas se caracterizan por presentar una homología del 99.95% en su genoma, con una proporción elevada de bases G+C (aproximadamente el 65%), y poseer una secuencia idéntica de la subunidad 16S del ARNr (Böddinghaus et al., 1990;). Sin embargo, estas especies difieren ampliamente en la preferencia de hospedador, fenotipos y patogenicidad.

Mycobacterium bovis es un microorganismo zoonótico causante de tuberculosis bovina, cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos, pulmones, hígado, bazo y peritoneo. Un granuloma tuberculoso suele presentar un aspecto amarillento y consistencia caseosa. El tamaño de las lesiones varía, desde tan pequeñas que pueden pasar desapercibidas a simple vista, hasta ocupar gran parte de un órgano (Araujo *et al*, 2013)

La tuberculosis bovina presenta un gran impacto económico los productores se ven afectados por el bajo rendimiento de los animales que al estar enfermos pierden peso,

disminuyen la producción de leche y la tasa de reproducción así como por la comercialización limitada y el decomiso de canales en rastro (Torgerson PR, 2001) .

El método establecido en la Norma Oficial Mexicana contra la tuberculosis bovina tiene como objetivo aislar *M. bovis* a partir de las muestras de tejido de bovino, remitidas por los médicos veterinarios oficiales de los rastros. Las últimas modificaciones a la norma se realizaron en el año 1998, sin embargo desde esa fecha se han desarrollado y utilizado nuevos métodos de envío de muestras y descontaminación. Se han desarrollado alrededor del mundo nuevos medios de cultivo para mejorar el aislamiento, pero en México no se pueden utilizar como sustitutos del método establecido en la norma oficial puesto que no se cuenta con información suficiente sobre la eficacia y eficiencia que pudieran presentar estos medios al ser utilizados en el procesamiento de las muestras para el aislamiento bacteriológico y además no se ha modificado la Norma Oficial Mexicana para que los incluya.

La sensibilidad del aislamiento depende de las técnicas utilizados en las distintas fases del procesamiento de la muestra, debido a que las muestras para el diagnóstico de tuberculosis presenta una microbiota acompañante alta, se debe descontaminar para reducirla o eliminarla. La descontaminación juega un papel muy importante durante el análisis puesto que puede afectar por intoxicación la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra. De igual forma el medio de cultivo puede afectar la posibilidad y el tiempo del aislamiento, el uso del medio de cultivo adecuado asegura la recuperación de las micobacterias en las muestras previamente descontaminadas.

Al comparar nuevos métodos tanto de descontaminación como de cultivo con los establecidos en la norma oficial mexicana se obtendrá información sobre las partes del proceso que están afectando en mayor proporción el resultado del diagnóstico al arrojar falsos negativos o positivos tardados.

Al determinar el método más eficaz para el aislamiento se podrá proponer la aplicación de éste para poder mejorar significativamente el tiempo y confiabilidad de los resultados en el diagnóstico de la tuberculosis bovina

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de *Mycobacterium bovis*

Mycobacterium bovis es la causa de tuberculosis en ganado y vida silvestre, por lo cual su incidencia afecta en gran manera a la producción animal y es un riesgo para la salud pública (Granje JM, 1994) los casos de tuberculosis humana debidos a *M. bovis* a nivel mundial se estiman que puedan ser de hasta el 7.2 (De la Rua Domenech, 2006). En humanos la principal ruta de transmisión de *M. bovis* es a través de la ingesta de alimentos de origen láctico sin pasteurizar, por esta razón *M. bovis* en humanos presenta frecuentemente un patrón de diseminación extrapulmonar (Muller B. *et al.* 2013), entre animales la principal forma de transmisión es a través de aerosoles y presenta un patrón de enfermedad pulmonar (Cosivi O, Granje JM, 1998).

En estudios realizados se encontró que hasta el 40% de animales libres de tuberculosis pueden infectarse al tener contacto con animales infectados y de éstos hasta el 10% desarrollaran lesiones considerables o signos clínicos, (CFSPH 2009). Lo anterior dificulta su diagnóstico oportuno y facilita la capacidad de dispersión entre animales y humanos (Baez S *et al* 2015).

2.2 Diagnóstico de tuberculosis bovina

En el ganado bovino no se perciben manifestaciones clínicas de la tuberculosis hasta que se han desarrollado lesiones muy extensas en el organismo del animal (Barron M. *et al* 2012). Por esta razón, no fueron posibles ni su diagnóstico en animales individuales ni un programa de erradicación antes del desarrollo de la prueba de tuberculina por Koch en 1890. La tuberculina, que representa un medio para detectar la enfermedad, es un concentrado estéril de filtrados de cultivo del bacilo tuberculoso cultivados en caldo de carne con glicerina y más recientemente, en medios sintéticos (OIE, 2009).

Los exámenes bacteriológicos podrían consistir en la observación de bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) mediante examen microscópico, lo cual proporciona una confirmación provisional (Buddle B. *et al.* 20155). El aislamiento de micobacterias

en medios de cultivo selectivos y su posterior identificación mediante cultivo y pruebas bioquímicas o técnicas de ADN, como la PCR, confirma la infección. La inoculación de animales, se ha utilizado en el pasado para confirmar la infección por *M. bovis*, actualmente casi no se utiliza por consideraciones relativas al bienestar animal (Corner L. *et al.* 1998).

Una gran dificultad en el diagnóstico de la tuberculosis bovina es que no se cuenta con una prueba simple y sensible para determinar la viabilidad de la bacteria más que el uso de cultivos, los cuales pueden presentar bajo porcentaje de aislamiento positivo especialmente si la muestra proviene de un animal reactor a la prueba de la tuberculina sin presentar lesión visible, esto se puede deber a la presencia de pocos bacilos en el tejido (Stewart LD, *et al.*, 2013).

2.3 Diagnóstico de tuberculosis en México

Erradicar la tuberculosis bovina traerá como beneficio el disminuir la incidencia de tuberculosis humana causada por *M. bovis*, aumentar la productividad de los hatos y evitar restricciones en la movilización de animales a nivel nacional como internacional. El diagnóstico de tuberculosis bovina en un hato se debe llevar a cabo considerando varios criterios que incluyen epidemiología, análisis clínico, análisis de laboratorio y aislamiento del agente etiológico (Cano, P., 2011).

En México se lleva a cabo una campaña nacional para la erradicación de la tuberculosis bovina en la cual se involucran el sector público y privado para promover el diagnóstico de campo en todos los hatos, aplicar las medidas adecuadas en hatos infectados y eliminar e indemnizar animales reactivos a la prueba de la tuberculina, para detectar nuevos casos así como para reconocer regiones de baja prevalencia y dar un seguimiento epidemiológico a los casos positivos.

Desde 1993 existe en México el comité México-Estados Unidos para la erradicación de la tuberculosis bovina, en 1994 se publicó la primer Norma Oficial Mexicana (**NOM-031-ZOO-1995**) contra la tuberculosis bovina y en 1996 la norma que regula la campaña nacional contra la tuberculosis bovina la cual sigue vigente (SENASICA,

2013). Se han tenido grandes avances en cuanto al paso de la fase de campaña de control a la fase de erradicación.

2.4 Diagnóstico acorde a la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995)

Las muestras remitidas de rastros a los laboratorios autorizados por SAGARPA para el diagnóstico de tuberculosis bovina son enviadas en solución saturada de borato (6%). La solución de borato de sodio 6% es considerada una solución antiséptica, que inhibe el crecimiento bacteriano, tiene efecto fungicida, es una sustancia amortiguadora y un estabilizador enzimático lo cual lo hace el medio de transporte adecuado para las muestras de tejidos sospechosos a tuberculosis. Sin embargo, el tiempo que la muestra puede permanecer en la solución de borato es un punto importante a tratar, pues excediendo los 90 días se disminuye considerablemente la viabilidad bacteriana, por lo que el análisis de laboratorio debe llevarse a cabo lo más pronto posible con un límite máximo recomendable de 10 días (Samra Z, 2000).

La muestras debe ser retirada del borato una vez que llega al laboratorio para llevar a cabo la descontaminación previa a la siembra, el objetivo de la descontaminación es eliminar la microbiota acompañante presente en las muestras de modo que las micobacterias en caso de estar presentes no tengan competencia por el uso de los componentes nutricionales del medio. La Norma Oficial Mexicana (NOM-056-ZOO-1995) especifica como método de descontaminación el método de Petroff o su variante ácido-álcali en las cuales se utiliza ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) (NOM-031-ZOO-1995).

La Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 ofrece opciones de medios de cultivo considerados adecuados para el cultivo de micobacterias, se contemplan los medios Herrolds con y sin huevo, MiddleBrook y Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (NOM-056-ZOO-1995). De las muestras maceradas y descontaminadas, se toma alícuotas con asas bacteriológicas para sembrar en medios selectivos y éstos se mantienen en incubación a 37 °C por 9 semanas antes de poder emitir un resultado negativo, en caso de haber crecimiento se resiembran las colonias y se incuban por 4 semanas antes de llevar a cabo la tipificación por medio de pruebas bioquímicas.

2.5 Técnicas distintas a las establecidas por las NOM-031-ZOO-1995

Para emitir un diagnóstico definitivo de tuberculosis bovina se necesita el aislamiento del microorganismo (Corner L. *et al* 2006), sin embargo las condiciones óptimas para llevar a cabo el aislamiento primario de *M. bovis* no están del todo determinadas y se han encontrado grandes diferencias influenciadas por el medio de cultivo utilizado, el método de descontaminación y el periodo de incubación (Mitali C. *et al.* 2013). Dejando bajos los porcentajes de aislamientos obtenidos con los métodos establecidos en la norma al compararlos con estos nuevos métodos o variaciones a los métodos tradicionales, sin embargo es necesario estudiar a fondo el beneficio de usar distintas metodologías para que puedan ser consideradas como adecuadas por la SAGARPA

2.6 Descontaminantes

El método más común a nivel mundial para descontaminar las muestras de tejidos bovinos es el de Petroff (Azevedo M. *et al.* 2015). En México es el establecido por la norma junto con su variante ácido-álcali, en ambas técnicas de descontaminación se expone la muestra a cambios bruscos de pH en donde el NaOH es efectivo eliminando la microbiota acompañante pero a la vez disminuye un gran porcentaje de la viabilidad de los bacilos presentes en la muestra (Corner LA, 2012).

Se han utilizado descontaminantes distintos que han disminuido el riesgo de contaminación y aumentado el número de aislamientos positivos (Ferroni A. *et al.* 2006). Algunos descontaminantes utilizados con buenos resultados han sido ácido sulfúrico, ácido oxálico, cloruro de benzalconio, laurilsulfato de sodio, cloruro de sodio y cloruro de hexadecilpiridinio (Robbe-Austerman y Bravo, 2013).

2.7 Medios de cultivo

El género *Mycobacterium* es altamente demandante de nutrientes y necesita alrededor de 5 semanas de cultivo para desarrollar colonias en medios como Stonebrinck, en medios mas enriquecidos como el Middlebrook reduce el tiempo de aislamiento a 3 semanas o menos (Medeiros *et al*, 2012). Los medios de cultivo mas utilizados por su fácil preparación y bajo costo son los hechos a base de huevo, el

medio Stonebrink es selectivo para *M. bovis* por la ausencia de glicerina la cual se usa en otros medios de cultivo para favorecer el crecimiento de *M. tuberculosis* y otras especies (Mukesh S *et al.* 2012). Se han desarrollado nuevos medios de cultivo que en comparación con los comúnmente usados, Lowenstein-Jensen y Stonebrink, han resultado más efectivos y han demostrado menores niveles de contaminación logrando con esto una confirmación del diagnóstico de tuberculosis bovina en menor tiempo, pero resultando en algunos casos más caro, sin embargo las mejoras en la precisión del diagnóstico han sido destacadas (Robbe-Austerman y Bravo, 2013; Stewart L., *et al.*, 2013 y Hines N., *et al.*, 2006).

La indicación de muy pocos medio de cultivo para el análisis establecido por la NOM-031-ZOO-1995 dificultan la capacidad de mejora de los laboratorios autorizados para ofrecer este tipo de análisis. Los medios de cultivo más utilizados aunque son baratos implican grandes inversiones de tiempo al tener que ser preparados manualmente y utilizar como componente clave huevo fresco el cual debe ser manejado con precaución para evitar contaminación y requiere largos periodos de coagulación antes de pasar a la prueba de esterilidad y de promoción de crecimiento (Kubica G. *et al* 2000).

2.8 Inmunoseparacion magnética

Stewart, *et al.* en 2012 desarrollaron un método de separación inmunomagnética para aislar células de *Mycobacterium bovis* de muestras de tejido bovino. Su método consiste en obtener anticuerpos y péptidos ligandos producidos en conejos y ratones y cubrir perlas de cristal para mezclarlos con macerados de la muestra y así obtener mayores porcentajes de aislamientos positivos. Este método demostró tener un excelente grado de sensibilidad de detección de *M. bovis* puesto que al no utilizar agentes químicos descontaminantes la viabilidad de los bacilos se mantiene elevada, permitiendo así su recuperación, sin embargo este método no esta considerado por la norma oficial mexicana como alternativa para ser utilizado y tampoco se ha evaluado en cepas mexicanas para comprobar su utilidad.

2.9 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

2.9.1. Generalidades

La microscopía de fuerza atómica es una técnica para la caracterización de superficies (Binnig et al 1986); este tipo de microscopía, se basa en la creación de imágenes digitalizadas mediante la medición de las fuerzas repulsivas y atractivas entre los átomos de una punta y los de una superficie. La microscopía de fuerza atómica (MFA) (Fotiadis et al. 2002), también conocida como microscopía de fuerza de barrido es capaz de crear una imagen tridimensional, de la estructura de la superficie de especímenes biológicos en un ambiente fluido, y así provee la oportunidad de observación, a resolución molecular, procesos bioquímicos y fisiológicos en tiempo real.

La MFA ha sido utilizada para crear imágenes de una gran variedad de macromoléculas biológicas individuales, células enteras, membranas y proteínas de unión a membrana, y procesos interactivos (Sokolov 2007). Durante la última década, la MFA se ha convertido en una herramienta poderosa para obtener detalles nanoestructurales y propiedades biomecánicas de muestras biológicas, incluyendo biomoléculas y células (Pelling et al. 2004; Charras y Horton 2002). Puede medir los cambios en las propiedades mecánicas de una membrana celular, la rigidez y la visco-elasticidad de una célula (Charras y Horton 2002).

2.9.2. Modos de operación

El MFA depende esencialmente de las fuerzas de repulsión o atracción entre una punta, colocada al final del cantiléver, y la muestra. En base a esto, y a las características físicas de la muestra y las propiedades a medir, el microscopio puede ser operado en modo de contacto, modo intermitente, tapping o semicontacto, y en modo de no-contacto (Tang et al. 1994; Fukui et al. 1997; González y Uribe 2005).

- Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie
- Tapping: También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie
- No Contacto: Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.

El modo de no contacto es operado en un rango de fuerzas, donde la fuerza total neta sobre el cantiléver es atractiva (negativa). A medida que la punta se aproxima a la muestra, las fuerzas de Van der Waals eventualmente se van haciendo repulsivas. Cuando la punta está en contacto con la muestra, las fuerzas repulsivas dominan el sistema, ejerciendo una fuerza total neta positiva sobre el cantiléver. Es en este rango de fuerzas donde es operado el microscopio en el modo de contacto (López 1996).

Hansma et al. 1997, mencionan que la microscopía de fuerza atómica, por su potencial de lograr resolución molecular y atómica, se ha colocado en una posición fundamental para el análisis de la materia a escala nanométrica, sin el problema de la preparación de material que debe colocarse en un ambiente de vacío, como sucede con el microscopio electrónico. Sus aplicaciones en el área biológica, principalmente se ha utilizado en el análisis de moléculas aisladas y procesos moleculares *in vitro*.

El microscopio de fuerza atómica es capaz de generar imágenes de muestras biológicas tanto fijadas como vivas en condiciones fisiológicas, basado en la interacción local entre la punta (cantiléver) y la superficie de una muestra (Jena y Horber 2002; Morris et al. 2001). Por otro lado, Czajkowsky y Shao 1998; Scheuring et al. 2001 mencionan que el MFA proporciona imágenes tridimensionales de superficies con muy alta resolución espacial que permiten cuantificar la profundidad y morfología de las muestras en tiempo real, en el orden de los nanómetros.

2.9.3. Aplicación biológica

La introducción de microscopía de fuerza atómica en estudios microbiológicos ha ayudado a los investigadores con un nuevo dispositivo para el análisis de la morfología bacteriana. Las características morfológicas específicas de la pared celular bacteriana podrían ser útiles en la identificación de factores específicos asociados con la gastritis o el cáncer de estómago en el caso de estudios con *H. pylori*. Hasta la fecha, este método todavía no se ha utilizado para estudiar las características morfológicas de *M. bovis* (Germano et al. 2013).

La principal ventaja de la MFA es la posibilidad de visualización de células vivas *in situ*, lo que hace que sea una técnica potente y muy útil para el estudio de las células bacterianas. Los resultados sugieren que la MFA es una técnica fiable para el estudio de la morfología bacteriana y para examinar las interacciones microbianas en epitelio gástrico (Meincken et al. 2005). Una de las ventajas de la MFA es la preparación de la muestra fácil y la alta resolución alcanzable. Esta condición hace que sea una herramienta prometedora en la investigación. La aplicación de este dispositivo ayuda a aumentar el conocimiento de la investigación de las especies bacterianas (Germano et al. 2013).

La ventaja más importante de la MFA en Biología, es el estudio de muestras biológicas directamente en su ambiente natural, especialmente en soluciones buffer, *in vitro*, *in situ*, e incluso *in vivo* (Sokolov 2007; Yang et al. 1999). También puede detectar la superficie de células vivas y fuerzas moleculares individuales en el campo de la Biología celular (Rabinovich et al. 2005; Zhao et al. 2005). Además no existe ninguna limitación en la elección del tipo de medio, acuoso o no acuoso, temperatura de la muestra, o composición química de la misma.

3. JUSTIFICACIÓN

Una de las limitantes en el diagnóstico de tuberculosis bovina es la baja tasa de aislamiento que se tiene a partir de muestras de tejidos con lesión visible o sin lesión visible. Esta baja tasa de aislamiento está asociada a la capacidad de seleccionar durante la inspección *post-mortem* los tejidos con lesión, a la presencia de pocos bacilos en el tejido con lesión, a los procesos de descontaminación que reducen la viabilidad de *M. bovis* y además que esta bacteria es de lento crecimiento lo que afecta el confirmar la presencia o ausencia de la bacteria en el cultivo. Existe una problemática con las limitantes del cultivo para obtener resultados negativos y por consiguiente se tiene una baja tasa de correlación entre animales reactivos y cultivo positivo.

Durante el análisis para realizar el diagnóstico de tuberculosis se presentan diversos obstáculos para llegar a un resultado confiable, estos obstáculos pueden ser el tipo de lesión que presente la muestra, las condiciones en que las muestras son enviadas al laboratorio, el tiempo transcurrido desde que la muestra fue tomada hasta que se procesa en el laboratorio, el daño ocasionado por el proceso de descontaminación, la sensibilidad de los medios de cultivo utilizados y el tiempo máximo requerido por las autoridades correspondientes para emitir resultados.

La principal problemática en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, en particular con el aislamiento bacteriológico es el tiempo y la sensibilidad de la prueba. Se requiere tener un resultado en un máximo de 9 semanas más 4 semanas para realizar la identificación de especie. Debido a la cantidad de variantes implicadas en el análisis, se pueden obtener resultados falsos negativos o positivos fuera del tiempo permitido, de modo que el encontrar la forma de mejorar estos aspectos se podrá mejorar el diagnóstico de tuberculosis bovina con el consiguiente beneficio para la salud pública como para la salud y economía pecuaria.

4. HIPÓTESIS

Es posible que empleando diferentes métodos a los establecidos por la NOM-031-ZOO-1995 se aumentara el porcentaje de aislamientos positivos de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos bovinos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar nuevas herramientas de laboratorio para mejorar la sensibilidad y rapidez del diagnóstico de tuberculosis bovina en México, mediante la implementación de separación inmunomagnética de *M. bovis* acoplando técnicas de aislamiento bacteriológico para mejorar la rapidez, sensibilidad y especificidad analítica.

5.2 Objetivos particulares

1. Obtener 50 muestras de nódulos linfáticos provenientes de ganado bovino clasificado como reactor, expuesto y sospechoso a tuberculosis.
2. Evaluar la eficacia de las técnicas de descontaminación: Técnica emitida por NOM-056-ZOO-1995, el método con cloruro de hexadecilpiridinio y descontaminación con cloruro de benzalconio aplicadas a cada una de las muestras.
3. Comparar la técnica de separación inmunomagnética, para captura de *M. bovis* a partir de macerados de nódulos linfáticos, en diferentes medios de cultivo que incluye el tradicional (medio sólido) que indica la NOM-031-ZOO-1995 y medios líquidos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material Biológico

Considerando que el Laboratorio Central Regional del Norte cuenta con la autorización para realizar las pruebas de laboratorio de histopatología y aislamiento microbiológico de acuerdo con lo que indica la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*M. bovis*) y además realiza la prueba de PCR a partir de tejidos para detectar organismos del complejo *M. tuberculosis*, se disponen de muestras de tejidos provenientes de animales con diferente estado sanitario tal como reactor:

- a) Reactor.- animal que tuvo reacción de hipersensibilidad en la prueba caudal simple y en la doble comparativa.
- b) Sospechoso.- animal que tuvo reacción en la prueba caudal simple, pero en la doble comparativa no tuvo un tamaño de reacción que permitiera catalogarlo como reactor y animales expuestos que provienen de hatos con animales reactivos.

Se analizó un total de 105 muestras de tejido remitidas al laboratorio para estudio. Considerando que las muestras fueron sometidas a la prueba de aislamiento microbiológico e histopatología, éstas están contenidas en solución de borato de sodio al 6% y formol bufferado al 10% respectivamente.

6.2 Histopatología

Las muestras contenidas en formol para el análisis histopatológico fueron cortadas en campana de bioseguridad con un grosor de aproximadamente 5mm, se colocaron en capsulas de inclusión y se lavaron con agua corriente por 25 minutos, después del lavado se introdujeron al histoquinete el cual fue programado para que en un periodo de 24 horas la muestra fuera sometida a deshidratación, aclaración e inclusión en parafina. Las muestras estuvieron 2 horas en cada jarra con los siguientes reactivos:

- Agua destilada..... 1500mL
- Alcohol etílico 70%..... 1500mL
- Alcohol etílico 80%..... 1500mL
- Alcohol etílico 96%..... 1500mL

- Alcohol etílico 96%..... 1500mL
- Alcohol etílico 100%1500mL
- Alcohol etílico 100%.....1500mL
- Alcohol-Xilol.....1500mL
- Xilol.....1500ml
- Xilol.....1500ml
- Parafina a 62°C.....1500ml
- Parafina a 62°C.....1500ml

El cubo procesado se cortó en micrótopo con un grosor de 3µm, el corte se colocó en portaobjetos agregando una gota de alcohol 70% y se dejó secar, antes de ser teñido usando la tinción de hematoxilina y eosina para observar la lesión tisular y tinción de Ziehl—Neelse para observar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. Los procedimientos de tinción se describen en la Tabla 1

Tabla 1

Procedimiento de tinción con hematoxilina y eosina

Solución	Tiempo (min)
Xilol	5
Xilol	5
Alcohol-xilol	3
Alcohol 100%	2
Alcohol 96%	2
Alcohol 80%	2
Lavado en agua	3
Hematoxilina de Harris	2
Lavado en agua	3
Alcohol ácido 1%	1 inmersión
Lavado en agua	1
Agua amoniacal	2 inmersiones
Lavado en agua	1
Alcohol 80%	2
Eosina-floxina	2
Alcohol 96%	2
Alcohol 100%	2
Alcohol-xilol	2
Xilol	2
Xilol	2
Montaje	

La tinción de Zihel-Neelsen se realizó de acuerdo a la Tabla 2

Tabla 2
Procedimiento de tinción de Zihel-Neelse

Solución	Tiempo
Carbol-Fucsina	25-30 minutos
Alcohol-ácido	Hasta decolorar a rosa pálido
Lavado en agua	4 minutos
Azul de metileno	1 minuto
Lavado en agua	4 minutos
Alcohol 96%	10 inmersiones
Alcohol-xilol	2 minutos
Xilol	2 minutos

6.3 Medios de cultivo

Se preparó el medio de cultivo Stonebrink y Lowenstein Jensen indicado en base a la NOM-031-ZOO-1995, a base de huevo con la siguiente composición:

A) Medio Stonebrink:

KH₂PO₄.....7 g
Na₂HPO₄-12H₂O.....8 g
Piruvato de sodio.....12.5 g
Verde Malaquita 2%..... 40.0 mL
Huevo fresco*.....2000 mL

* Una vez disueltos estos reactivos en 1000 mL de agua destilada se añadió el huevo

B) Medio Lowenstein-Jensen

Base medio Lowenstein (BD Difco).....37.2 g
Glicerina.....12 mL
Una vez disueltos estos reactivos en 600 ml de agua destilada se añade el huevo
Huevo fresco.....1000 ml

Una vez preparados los medios se dispensaron en tubos de vidrio esteriles en una cantidad de 7 mL en cada uno, posteriormente se coagularon en coagulador inclinado a 75°C por 15 minutos o hasta que la consistencia del medio fuera firme pero sin presencia de burbujas. Se realizó prueba de esterilidad por 28 h antes de poder ser usados.

6.4 Aislamiento bacteriológico

Una vez recibidas las muestras, en solución de borato de sodio, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio (Hipoclorito de sodio comercial al 5.5%, preparado en una dilución de 1:1000 en agua destilada) para eliminar el exceso de solución de borato, posteriormente se refrigeró hasta el momento de trabajarla. Posteriormente, bajo campana de bioseguridad nivel III, con la ayuda de las tijeras y pinzas estériles, se quitó la grasa y tejido conectivo de la muestra a procesar. Si la lesión fue muy grande o tenía mucho exudado, se eligió una parte interna y una parte externa de la lesión; cuando la muestra fue muy pequeña se incluyó toda. En caso de no haber lesiones visibles, se seleccionó una porción representativa de la muestra, la muestra fue cortada en trozos pequeños y fue macerada con ayuda de un poco de agua destilada estéril en licuadora, el tiempo de macerado fue de 1 a 2 minutos. Se colocó una parte de este macerado en el tubo identificado como réplica que fue congelado. A partir del tejido macerado se realizó la separación inmunomagnética (IMS) utilizando perlas magnéticas a las cuales se les unió el anticuerpo monoclonal específico para *M. bovis*. Además otra porción del tejido se continuó el proceso de aislamiento de acuerdo a lo que indica la Norma Oficial Mexicana. Se evaluó medios de cultivo líquidos. Los procesos antes mencionados se realizaron apegándose a las buenas prácticas de laboratorio (BPL), medidas de bioseguridad, instructivos y procedimientos establecidos en el Sistema de Calidad del Laboratorio Central Regional de Norte.

6.5 Lavado y descontaminación de la muestra

6.5.1 Método variante de Petroff

Todos los procedimientos del análisis se llevaron a cabo dentro de la campana de seguridad biológica nivel III.

Al llegar la muestra al laboratorio en solución de borato de sodio 6% se procedió al lavado de la misma con una solución de hipoclorito de sodio 1:1000 para inactivar la capacidad bacteriostática del borato de sodio y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta el momento de ser macerado en licuadoras estériles usando agua destilada estéril previo a la descontaminación.

El proceso de descontaminación se llevó a cabo por el método de la variante de Petroff, establecido en la NOM-031-ZOO-1995, el cual consiste en:

- a) tomar una porción del macerado
- b) agregar 5 partes de HCl al 10% estéril
- c) agregar 2 gotas de solución de rojo de fenol 1% (como indicador de pH)
- d) dejar reposar por 20 minutos
- e) adicionar gota a gota NaOH 2 N (para neutralizar) hasta que el indicador de pH viró dando una apariencia violeta.
- f) la muestra neutralizada se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga de seguridad biológica
- g) el sobrenadante se desechó, quedando la pastilla lista para ser sembrada el mismo día
- h) las muestras descontaminadas se sembraron en los medios establecidos por la NOM, Lowenstein-Jensen y Stonebrink.
- i) del macerado que se descontaminó, de acuerdo a la NOM, se sembraron 2 tubos de medio Stonebrink y uno de Lowenstein-Jensen
- j) se incubaron a 37 °C por 9 semanas realizando lecturas semanales.

6.5.2 Descontaminación con método Petroff/USDA

Un segundo grupo de 105 muestras de nódulos linfáticos bovinos se procesó utilizando una adaptación del método de Petroff y del método recomendado por la USDA el cual nombramos Petroff/USDA. En este caso se les dio el mismo tratamiento a la muestra hasta antes de la descontaminación, se retiró de la solución de borato y se mantuvieron las muestras en refrigeración hasta el momento de su análisis. Las muestras fueron procesadas como se describe a continuación:

- a) Las muestras fueron maceradas en caldo rojo de fenol (BD Bioxon) en una proporción de hasta 2g en 7 mL de caldo rojo de fenol
- b) se transfirió a un tubo cónico de centrífuga de 50 mL
- c) se le agregó 5 mL de NaOH 1N llevando el indicador de pH a un color violeta que indicó pH alcalino
- d) posteriormente se mantuvo en agitación constante por 8 min
- e) después se agregó HCl 6N gota a gota hasta que el indicador de pH viró a amarillo indicando un pH ácido

- f) una vez que se llevó a cabo el cambio de pH se neutralizó el macerado con NaOH 1N gota a gota hasta que el indicador viró a anaranjado indicando un pH neutro.
- g) una vez neutralizada la muestra se retiró de la campana de seguridad para ser centrifugada en centrífuga de seguridad biológica a 4700 gx 23 m
- h) después del ciclo de centrifugación se procedió a retirar el sobrenadante para poder utilizar la pastilla como material de siembra,
- i) la pastilla se sembró por cada muestra 2 tubos de medio Stonebrink y uno de Lowenstein-Jensen
- j) se incubaron a 37°C por 9 semanas.

6.5.3 Descontaminación con agentes distintos al NaOH

Lavado y descontaminación de la muestra

El proceso de descontaminación para comparar la eficacia de los agentes distintos al NaOH se lleva a cabo por 3 métodos distintos:

- a) el establecido en la NOM-031-ZOO-1995, el cual será la variante ácido-álcali del método de Pettrof el cual consiste en tomar una porción del macerado y agregar 5 partes de HCl al 10% estéril usando como indicador de pH 2 gotas de solución de rojo de fenol 1% y se deja reposar por 20 minutos, después de los cuales se neutraliza con la adición de NaOH 2 N hasta que el indicador de pH vire dando una apariencia violeta. La muestra neutralizada se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga de seguridad biológica y el sobrenadante se desecha, quedando el pellet listo para ser sembrado el mismo día.
- b) El método con cloruro de hexadecilpiridinio consiste en agregar a partes iguales material macerado y solución de cloruro de hexadecilpiridinio al 1.5% y dejar reposar por 30 minutos, después de los cuales se centrifuga al igual que el método de la variante de Pettrof y se descarta el sobrenadante para proseguir con la siembra.
- c) Para la descontaminación con cloruro de benzalconio, añadir a partes igual una solución de cloruro de benzalconio al 0.3% al macerado y se dejar reposar por

30 minutos, después se centrifuga en las mismas condiciones que en los métodos anteriores.

Después del proceso de descontaminación se inoculó por triplicado un ml de la suspensión descontaminada en medio de cultivo Stonebrinck y se incubó a 37 °C por 3 semanas para una posterior lectura y conteo del promedio del número de colonias.

6.6 Separación inmunomagnética (IMS)

6.6.1. Preparación del inóculo: En un tubo de cultivo 20x125 mm estéril con 5 ml PBS y perlas de vidrio se colocaron colonias de la cepa control de *M. bovis* y se agitó hasta eliminar los grumos visibles. Con la suspensión de la cepa control se realizó una dilución ajustada al 1 escala de MacFarland (agregando colonias o PBS según fue necesario) lo cual resultó en una concentración de 10^8 UFC/ml (100,000,000 UFC).

6.6.2 Se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de la concentración con 10^8 UFC/mL tomando 1 mL y homogenizándolo en un tubo estéril con 9 mL de PBS lo cual resultó en una dilución de 10^7 UFC/mL, se realizó el mismo procedimiento hasta obtener una dilución de 10^2 UFC/mL (100 UFC). Se realizó la separación inmunomagnética (IMS) de las diluciones 10^8 , 10^5 y 10^2

6.6.3 Separación Inmunomagnética (IMS): Para la IMS se utilizó el equipo King Fisher (Thermo, Kingfisher mL). El procedimiento fue el siguiente:

a) En la tira de tubos se cargó los pozos a utilizar de la siguiente manera:

- 1er. Pozo 10 µl de perlas
- 2° Pozo 1 mL de PBS-Tween 20 al 0.05%
- 3er Pozo 1 mL de PBS-Tween 20 al 0.05%
- 4° Pozo 300 µL de PBS

b) Se prepararon las tiras de tubos para las tres diluciones

c) Se colocó 1 mL de la dilución de la cepa a trabajar en el primer pozo de la tira de tubos.

- d) El programa utilizado en el equipo Kingfisher consistió:
- 1er Pozo a 30 minutos de agitación a velocidad media
 - 2º Pozo a 1 minuto de agitación a velocidad media
 - 3er Pozo a 1 minuto de agitación a velocidad media
 - 4º Pozo a 10 segundos de agitación a velocidad alta

La separación inmunomagnética de *M. bovis* se realizó para sustituir el proceso de descontaminación química previo a la siembra, con estas muestras se realizó PCR para comprobar la captura selectiva de *M. bovis* y también fue utilizada para observar al AFM la estructura de los bacilos cuando no son sometidos a descontaminación.

6.7 Prueba de PCR

Para confirmar que las esferas con el anticuerpo atrapan a *M. bovis*, se realizó PCR a las diluciones de 10^8 , 10^5 y 10^2 . Se realizaron acorde a las siguientes etapas:

- a) Inactivación de la suspensión: Obtenidas las muestras finales de la IMS se procedió a tomar 10 μ L e introducirlos en un tubo eppendorf de 1.5mL con 500 μ L de etanol 70% por 2 horas para inactivar la cepa y transportarla al Laboratorio de Biología Molecular.
- b) Tratamiento de la muestra: Se centrifugó el tubo eppendorf a 13,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces la pastilla con 300 μ L de agua destilada, en cada lavado se resuspendió la pastilla y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se resuspendió la pastilla final en 500 μ L de agua destilada usando vortex y una perla de vidrio de 4 mm de diámetro. Los primers utilizados amplifican la secuencia de inserción IS6110, la cual se encuentra en el complejo *M. tuberculosis* al cual pertenece *M. bovis*. Los primers presentan una secuencia de 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3' y 5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'
- c) PCR: Se prepararon los tubos con los reactivos de PCR como lo indica la Tabla 3

Tabla 3

Reactivos y volumen utilizados para la PCR punto final

Reactivo	Reacción 1X (μL)
2X Terra direct Buffer (con Mg ²⁺)	25
Primer 1	1.0
Primer 2	1.5
Muestra resuspendida en agua destilada	≤ 5
TERRA PCR direct Polymerase Mix	1
Agua destilada estéril	16
Volumen total	50

- d) Una vez preparados los reactivos en los tubos se procedió a introducirlos en el termociclador bajo las condiciones indicadas en la Tabla 4

Tabla 4

Temperaturas, tiempos y ciclos de PCR tiempo final

Temperaturas	Tiempo	Número de ciclos
98°C	2 minutos	1
98°C	45 segundos	50
72°C	75 segundos	50
72°C	10 minutos	1
4°C	Indefinido	0

- e) Se preparó un gel de agarosa al 1.5% usando SB1X y agarosa (0.75g) en un volumen final de 50 mL en un matraz que se introdujo en microondas por 1.5 min, una vez que la mezcla se enfrió se agregaron 2 μL de bromuro de etidio y se vertió en un recipiente donde se insertó el peine para formar los carriles para correr las muestras, una vez terminada la corrida de PCR las muestras se corrieron en el gel durante una hora.

6.8 Análisis morfométrico de *M. bovis* aislada con diferentes tratamientos

Para la caracterización morfométrica de las muestras de *M. bovis* se utilizó un microscopio de fuerza atómica, modelo NTEGRA PRIMA, marca NT-MDT, el cual fue operado en el modo contacto y contacto intermitente. Las puntas que se utilizaron tanto para las micrografías como para las medidas elásticas fueron de un modelo CSG 10/10 de la misma marca, cuya constante de deflexión (kc) nominal especificada por el fabricante fue de 0.11 N/m aproximadamente; además, una longitud de $225 \pm 5.0 \mu\text{m}$ por $30 \pm 3.0 \mu\text{m}$ de ancho, un espesor de $1.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$, con una frecuencia de resonancia de 22 kHz y un radio de curvatura de 6.0 nm. El MFA

fue operado por Ing. Marco Mendoza de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas-UANL.

6.8.1 Modos básicos de operación

Colocación de la punta y ajuste de la señal del láser: Antes de la realización de cualquier medida, en primer lugar, fue necesario colocar la punta y ajustar el láser. La punta se colocó en el soporte con la ayuda de unas pinzas, deslizándola por la ranura del soporte. Seguidamente se colocó el soporte con la punta dentro de la cabeza del MFA y se procedió al ajuste de la señal del láser.

Alineación del láser: Para el alineamiento del láser se hizo uso de una lupa monocular, suministrada con el equipo para observar la posición del haz del láser sobre el cantiléver de la sonda de medida. Con ayuda de los dos botones de la cabeza del MFA, se posicionó el haz del láser encima del sustrato. Enseguida, se posicionó el haz en el borde del sustrato moviendo para ello el botón correspondiente al eje X. Con el botón de ajuste del eje Y se buscó el centro del cantiléver de la sonda de medida. Finalmente con los dos botones de ajuste en los ejes X y Y se terminó de posicionar la señal del láser en el centro del cantiléver, observando la intensidad de la señal que le llegaría al fotodetector. Si la intensidad de la señal era baja, ésta se podía aumentar variando ligeramente la inclinación del espejo que se encuentra dentro de la cabeza del microscopio hasta conseguir la intensidad adecuada.

Obtención de las muestras: Las muestras que se analizaron por MFA, se obtuvieron de los ensayos biológicos de IMS para *M. bovis* en presencia de los tratamientos seleccionados.

Preparación y adhesión de las muestras: En un portaobjetos se agregaron 20 μ L de agua purificada y se colocó enseguida muestra de *M. bovis*, por asada o aproximadamente 10 a 20 μ L, procedente de los bioensayos previamente realizados; se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente y cubiertas adecuadamente para evitar cualquier tipo de contaminación y con el fin de lograr la adhesión de la muestra en el portaobjetos. Una vez terminado este procedimiento, se inició el análisis por MFA.

Observación de la muestra

Modo de contacto: El modo contacto (Contact Mode) del MFA operó barriendo la punta en las direcciones X, y en contacto permanente con la muestra, aplicando una fuerza constante ($F = \text{constante}$) y sin levantar la punta de la superficie. La fuerza aplicada está relacionada con la deflexión que experimenta la punta mediante la constante de fuerza del cantiléver; así $F = -k \cdot D$, donde F es la fuerza aplicada, k es la constante de fuerza del cantiléver y D la deflexión. Por tanto, trabajar a una determinada deflexión ($D = \text{cte.}$) es equivalente a trabajar a una fuerza constante, pues son proporcionales. Así, se fijó la deflexión de trabajo (D_{sp} ; $sp = \text{setpoint}$) y, a medida que se hacía el barrido, el escáner subía o bajaba (en Z) para mantener una deflexión constante ($D = \text{cte.} \Rightarrow F = \text{cte.}$). El movimiento vertical del tubo de barrido permitió obtener una imagen topográfica de la muestra que generalmente se llama Imagen de Alturas (Olmos y González 2009).

Modo de contacto intermitente (tapping): En el modo de contacto intermitente ("tapping mode") se aplica una señal sinusoidal, haciendo oscilar a la punta a su frecuencia de resonancia. Los barridos se efectuaron a una amplitud de oscilación constante, denominada amplitud de trabajo o A_{sp} ($sp = \text{setpoint}$). El escáner de barrido subió y bajó (en Z) para mantener esa amplitud constante en todo momento. El movimiento vertical del tubo de barrido, proporcionó, de nuevo la imagen topográfica (Imagen de Alturas). Por otra parte, por efecto de la interacción de la punta con los distintos constituyentes de la muestra, se produjo un cambio en la fase de la onda sinusoidal aplicada, esto fue, un desfase. El registro de este desfase, permitió obtener la denominada Imagen de Fase. El cambio en la fase de la señal sinusoidal está relacionado con las propiedades mecánicas y visco-elásticas del material bajo observación, es decir, a sus constituyentes (o fases) (Olmos y González 2009).

Obtención de las curvas de fuerza-distancia: El principio básico mediante el cual se generaron las curvas de fuerzas, se basó en la capacidad de registrar la fuerza ejercida entre la punta "cantilever" y la muestra, a medida que éste se aproximó, tocó y retrayó en un punto sobre su superficie. Los mapas de volumen de fuerza contienen un arreglo de curvas de fuerza a lo largo de un área o superficie de la muestra. Cada

curva de fuerza fue medida en un único punto (x, y) del área de la muestra. Un arreglo de curvas de fuerza de muchos puntos x_n, y_n pertenecientes a distintos planos en el eje Z, se combinaron para formar un mapa tridimensional o volumétrico (x, y, z) de datos, que contenían la información acerca de las propiedades mecánicas, químicas, magnéticas o electroestáticas de la superficie (Rosso 2012). Las gráficas se obtuvieron con el programa Excel 2007 de Microsoft Office y los datos fueron proporcionados por las micrografías obtenidas de las muestras de *M. bovis* bajo los efectos de los extractos.

6.9 Análisis estadístico

De los datos obtenidos se generó un promedio para cada uno de los tratamientos y se comparó con los obtenidos por los datos del control, esto mediante un análisis de varianza con una $P < 0.05$, empleando una prueba de Dunnet, de dos colas, con ayuda del Paquete Estadístico SPSS.

Los resultados obtenidos de las muestras ingresadas en los años 2015 y 2016 para los análisis de histopatología y aislamiento bacteriológico se utilizaron para calcular el índice Kappa. En el año 2015 se evaluaron un total de 1,373 y para el año 2016 se analizaron un total de 475.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo e histopatología

Se procesaron 105 muestras por histopatología y bacteriología de acuerdo a la NOM-ZOO-056-1995; en histopatología si la tinción indentificaba una lesión característica de tuberculosis (Figura 1) y con la tinción Ziehl Neelsen identificaba un báculo ácido acohol resistente se consideraron compatibles (Figura 1). Las muestras que al ser sembradas expresaron crecimiento característico se consideraron positivas y positivas a *M. bovis* si la identificación bioquímica correspondía al control positivo de *M. bovis* (Tabla 5).

Tabla 5

Identificación bioquímica de *M. bovis*

	Prueba de:	Reacción
1	Niacina	Negativa (-)
2	Nitratos	Negativa (-)
3	Catalasa a 37°C	Positiva (+)
4	Catalasa a 68°C	Negativa (-)
5	Crecimiento a 45°C	Negativa (-)
6	Producción de pigmentos	Negativa (-)

- a) Análisis histopatológico: La tinción de hematoxilina y eosina mostró el citoplasma de las células en color azul y otros elementos tisulares en un rango de rojo a rosa (Figura 1).

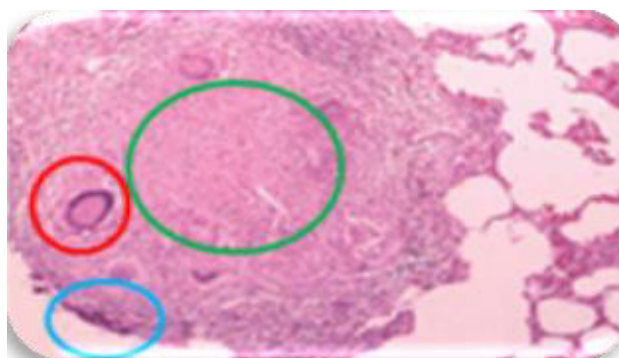


Figura 1.- Aspecto de un granuloma típico de *M. bovis* en tejido, se observa un foco necrotico (verde), formacion de células gigantes (rojo) e infiltrado inflamatorio (azul).

- b) Análisis microscópico: La tinción de Zihel-Neelsen mostró la presencia de BAAR en color rojo y otros elementos tisulares en color azul pálido (Figura 2).



Figura 2.- Aspecto de *M. bovis* teñida con la técnica Ziel-Neelsen (círculo).

Se obtuvieron 40 muestras con resultados no compatibles por histopatología ni presentaron aislamiento, 65 muestras resultaron compatibles por histopatología, de éstas solo 25 tuvieron crecimiento característico de micobacterias las cuales al ser identificadas por las pruebas bioquímicas establecidas en la NOM resultaron ser 20 aislamientos de *M. bovis* (30.7% de las muestras compatibles por histopatología y 80% de las muestras con crecimiento) y 5 de micobacterias atípicas (7.6% de las muestras compatibles por histopatología). El análisis de concordancia indicó no concordancia entre las técnicas diagnósticas establecidas por la NOM-ZOO-056-1995 (Figura 3).

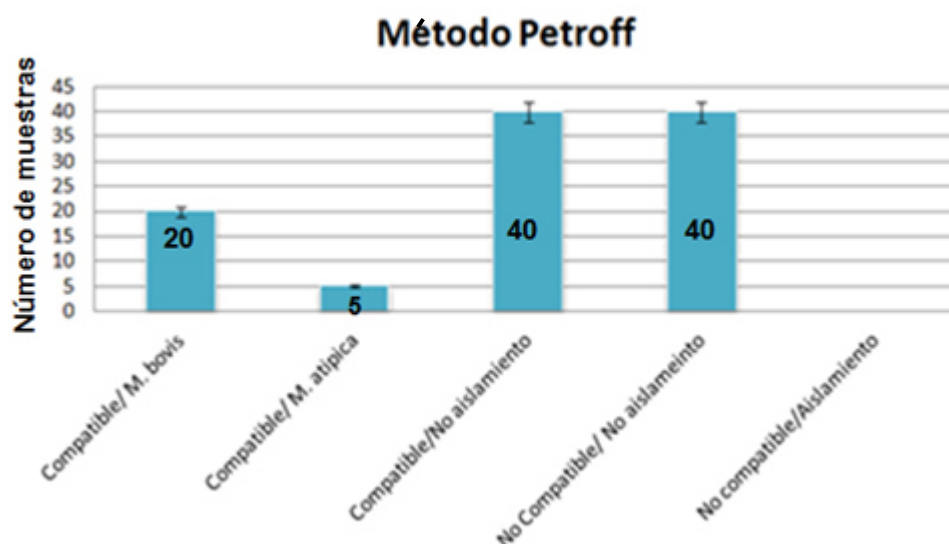


Figura 3. Relación de resultados obtenidos mediante el método de Petroff de la prueba de histopatología y aislamiento. Se observa un bajo número de aislamientos positivos identificados como *M. bovis* (20) y bajo número de aislamiento de micobacterias atípicas (5).

Al analizarse 105 muestras por histopatología de acuerdo a la NOM-ZOO-056-1995 pero por bacteriología utilizando el método de descontaminación modificado de Petroff/USDA se obtuvieron 77 muestras compatibles con tuberculosis de las cuales 59 expresaron crecimiento, al ser identificadas las 59 muestras se obtuvieron 25 aislamientos de *M. bovis* (32.4% de las muestras compatibles y 42.3% de las muestras con crecimiento) y 34 de micobacterias atípicas (44.1% de las muestras compatibles por hitopatología y 57.6% de las muestras con crecimiento). Demostrándose el aumento en la sensibilidad del aislamiento usando la descontaminación modificada y la capacidad de recuperar mayor cantidad de micobacterias atípicas (Figura 4).

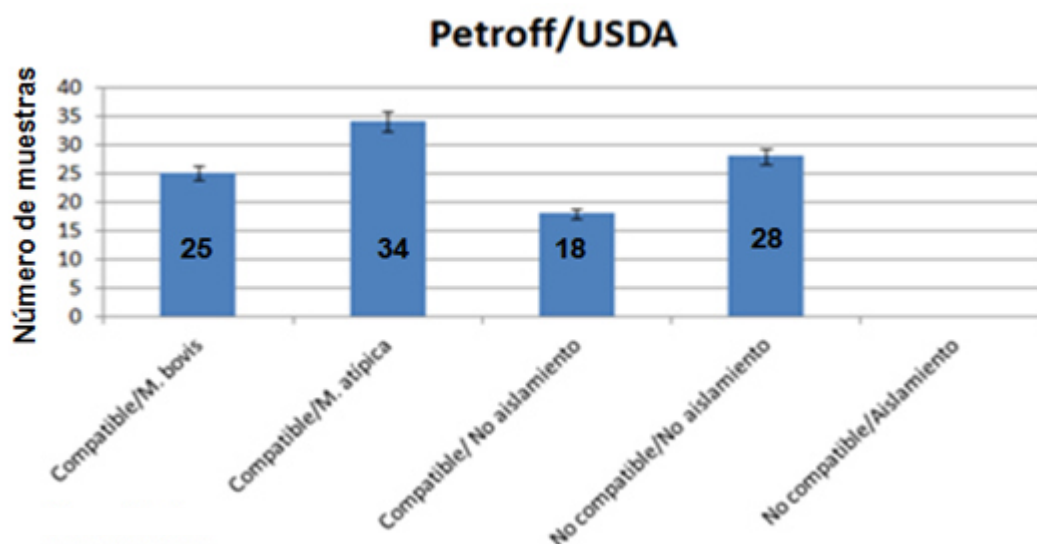


Figura 4. Relación de resultados obtenidos de la prueba de histopatología y aislamiento, se observa un número considerable de aislamientos identificados como *M. bovis* (25) y micobacterias atípicas (34).

7.2. Estandarización de la técnica de separación inmunomagnética (IMS) y detección por PCR de *M. bovis* a partir de suspensiones bacterianas.

Se realizaron por duplicado diluciones decimales, a partir de una dilución de cepa de *M. bovis* con 10^8 UFC/mL, hasta obtener una dilución de 10^2 UFC/mL. Las concentraciones 10^8 10^5 y 10^2 fueron sometidas a IMS, posteriormente se realizó la detección por PCR de *M. bovis* capturada por IMS. Se logró la amplificación a partir

de las concentraciones de 10^8 y 10^5 UFC/mL en una repetición y en la siguiente se obtuvo la amplificación en las 3 concentraciones (Figura 5).

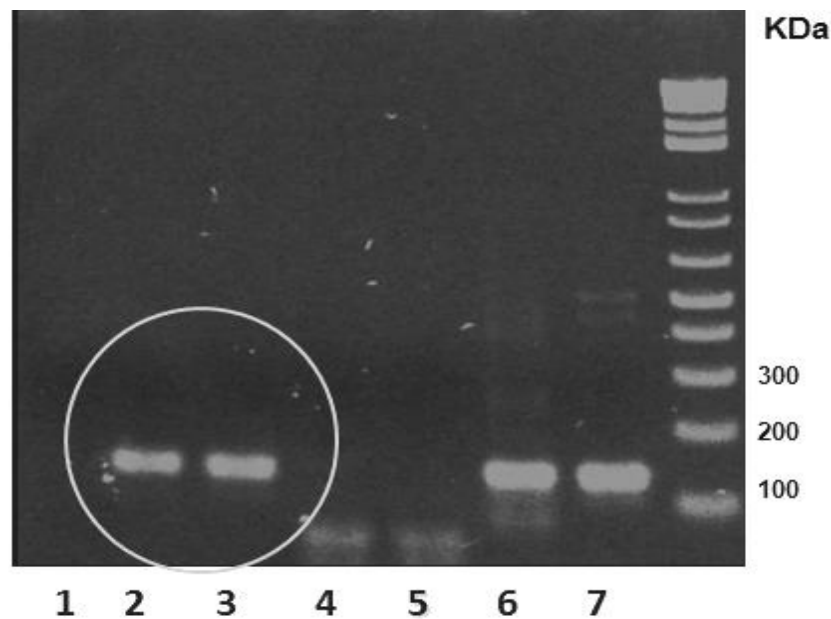


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la cepa de referencia. Carril 1: dilución 10^2 , Carril 2: Dilución 10^5 , Carril 3: Dilución 10^8 , Carril 4: Blanco de extracción, Carril 5: blanco de PCR Carril 6: control positivo, Carril 7: control positivo, Carril 8: Marcador de peso molecular.

7.3 Análisis de *M. bovis* al Microscopia de Fuerza Atómica (MFA)

a) *M. bovis* control

Se observaron al microscopio de fuerza atómica suspensiones bacterianas de un cultivo puro que no había sido sometido a ningún proceso de descontaminación obteniendo imágenes con las que se puede apreciar la interesante topografía de *M. bovis*, en la cual se puede apreciar que en una de las regiones la pared celular se observa con mayor aspecto corrugado, aproximadamente la mitad de la superficie celular presenta este aspecto y el resto se observa una topología lisa (Figura 6).

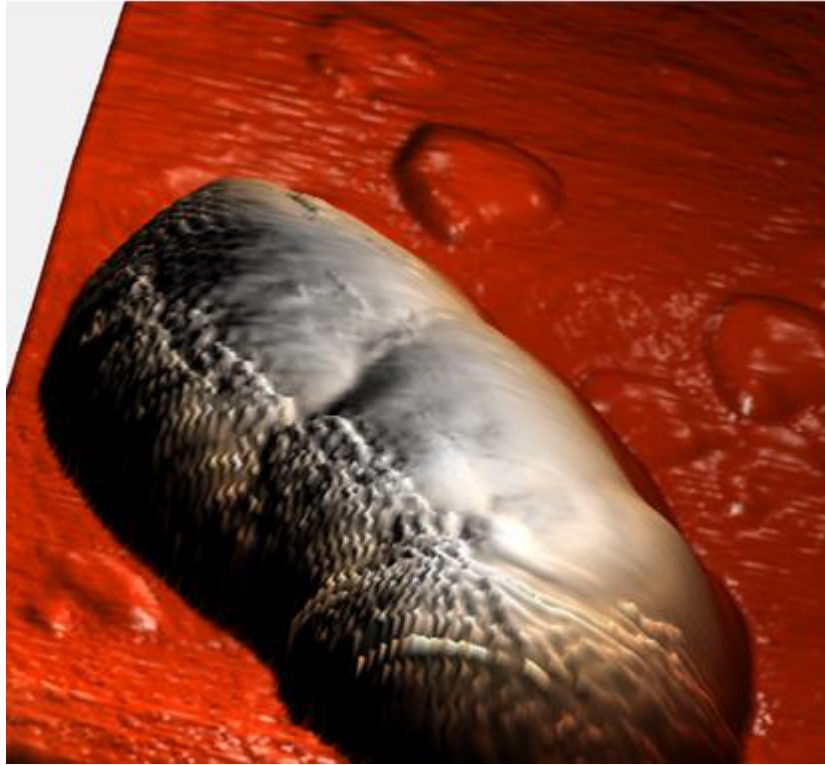


Figura 6.- Aspecto topológico del *M. bovis* control al MFA.

En la Figura 7A se observa la agrupación de dos bacterias bordeadas por un material rugoso (flecha), en la imagen 7B se muestra la imagen de magnitud, la cual nos indica la diferencia en composición del cuerpo de las células y el material que las bordea y en la Figura 7C se observa una célula de *M. bovis* en la cual se aprecia su topología, observando que una región de la célula presenta mayor rugosidad que el resto del cuerpo celular, este aspecto fue el patrón topológico para el control de *M. bovis*, además fue posible determinar que la bacteria tiene una altura promedio de 440nm (Figuras 7 D a F).

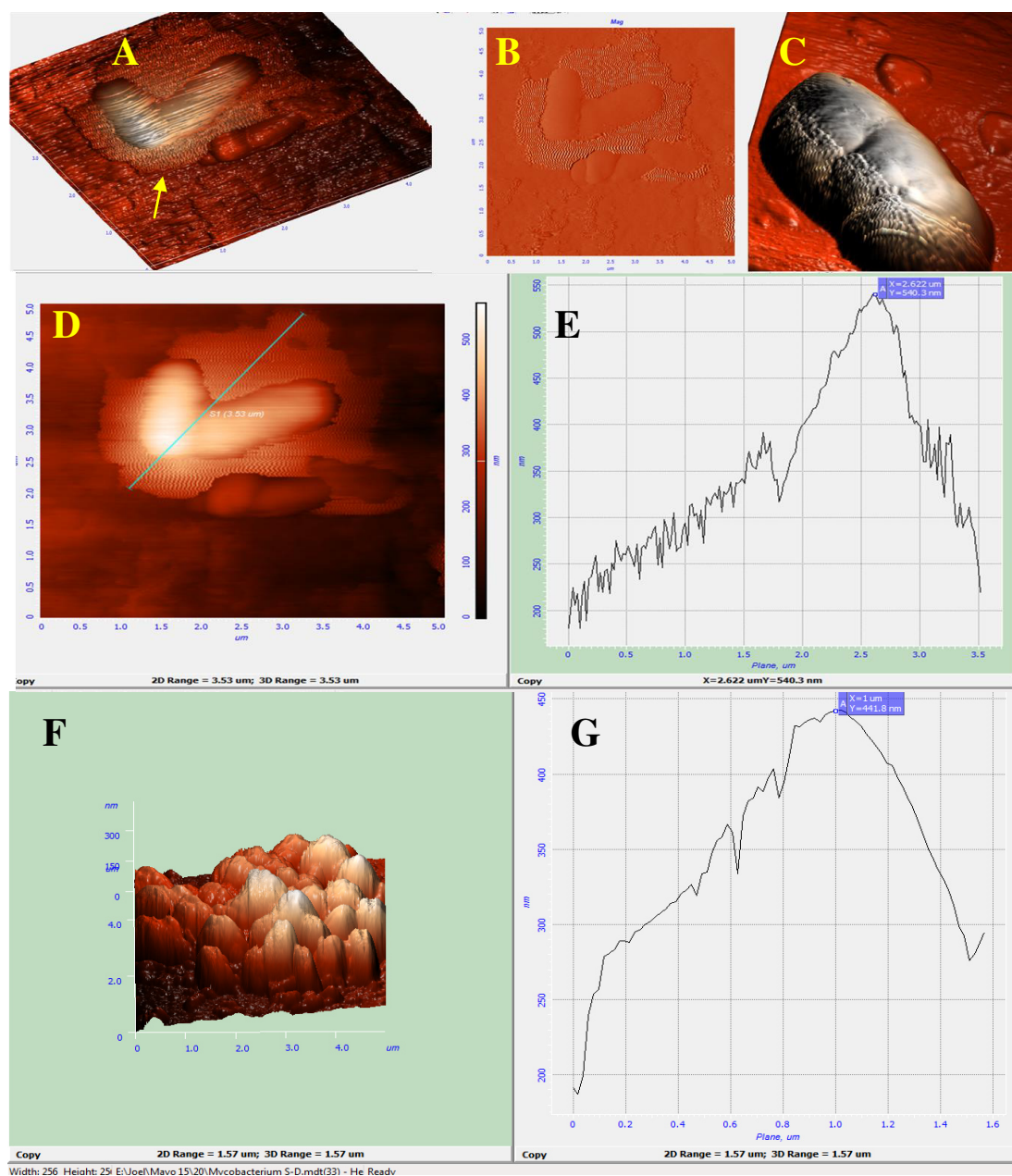


Figura 7.- Anàlisi de *M. bovis* control al MFA. El anàlisi al MFA permete determinar diversos paràmetres com la topografia cel·lular (A, B y C) y paràmetres morfològics com la altura (D, E, F y G).

b) *M. bovis* descontaminada

Se observaron también al MFA cepas después del proceso de descontaminación de acuerdo a la NOM, en la Figura 8A se observa el patrón de altura, la zona más clara representa la zona más alta y la región oscura representa la zona más profunda, en la Figura 8B se observa una agrupación de células observadas al AFM en las cuales se aprecia la presencia de ligeras rugosidades en uno de los extremos de la célula, patrón repetitivo en todas las células. En las Figuras 8 C, D, E, F y Figura 9 y 10, se observan diversos análisis topológicos, en C se observa el análisis en un plano del conglomerado celular, observándose de un tono similar la mayor parte de la muestra, sin embargo uno de los extremos de las células muestran regiones más claras, lo cual indica zonas de mayor altura; sin embargo al análisis de altura (Figuras D y E) nos indica una altura promedio de $2.5\mu\text{m}$.

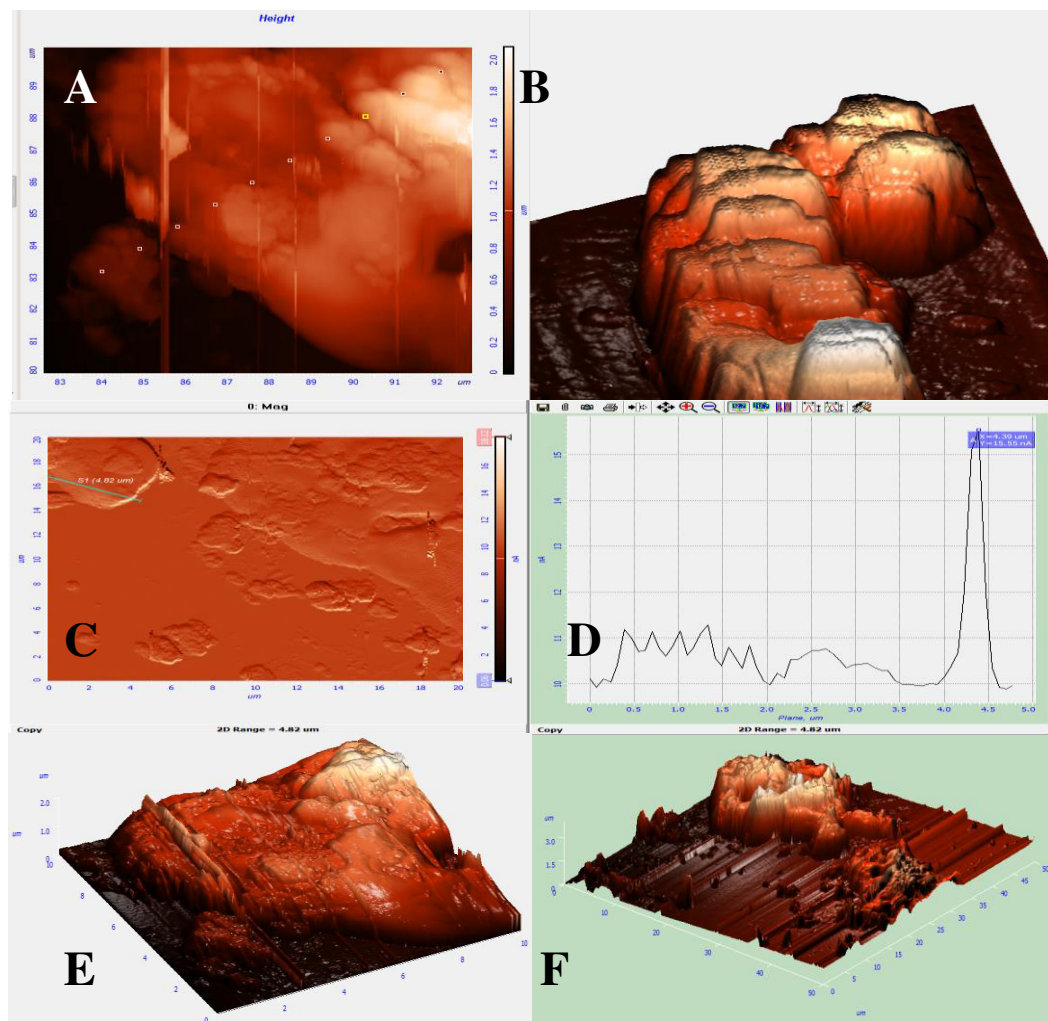


Figura 8.- Anàlisis al MFA de *M. bovis* descontamina según NOM. En A se observa el análisis de altura, en B se observa el análisis topológico en 3D del conjunto de células, en C se observa el análisis de altura, así como en E y F.

En la Figura 9 se muestra el análisis topológico de la célula, observando un valor de altura de 829.5 nm,

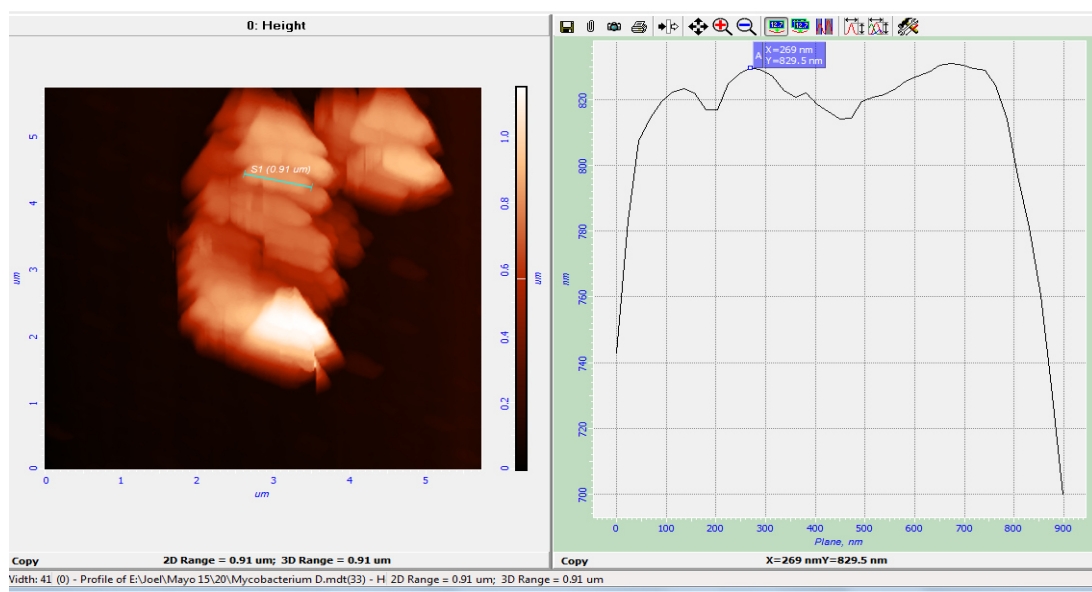


Figura 9. Determinación de la altura de la célula de *M. bovis* descontaminada de acuerdo a la NOM.

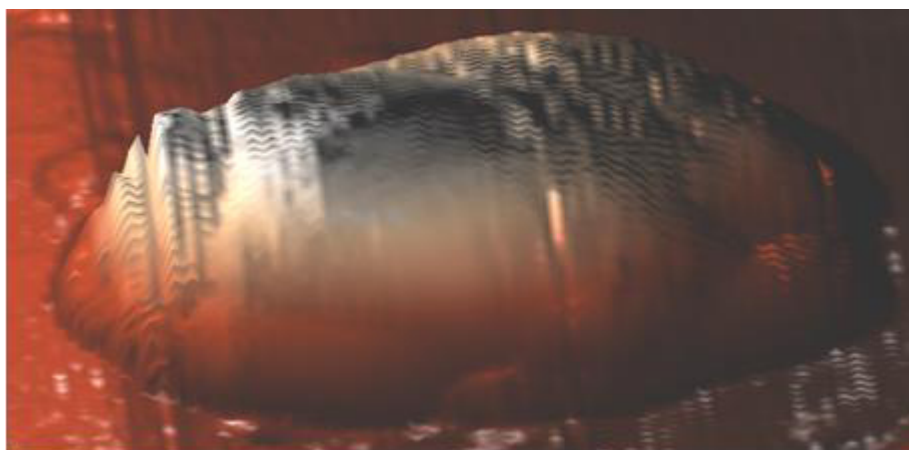


Figura 10. Acercamiento a la célula de *M. bovis* descontaminada de acuerdo a la NOM, donde se aprecia la topografía bacteriana al ser analizada al MFA

c) *M. bovis* obtenida por separación inmunomagnética (IMS)

Se sometió a AFM una suspensión bacteriana de *M. bovis* sometida a IMS para comparar su estructura externa con las cepas sometidas a descontaminación (Figuras 11, 12 y 13).

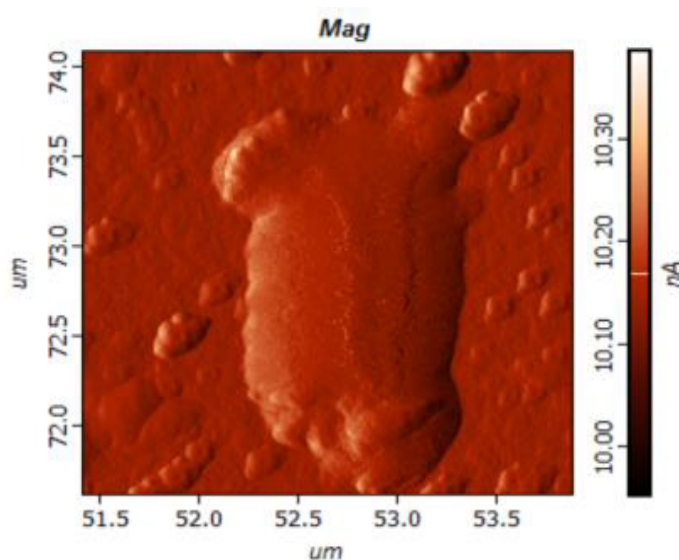


Figura 11 Célula de *M. bovis* sometida a IMS. Se observan protuberancias en ambos extremos del bacilo, así como estructuras alrededor del mismo.

La misma imagen vista en el modo de fases, mostrando la diferencia de materiales en las protuberancias de los extremos del bacilo (Figura 11).

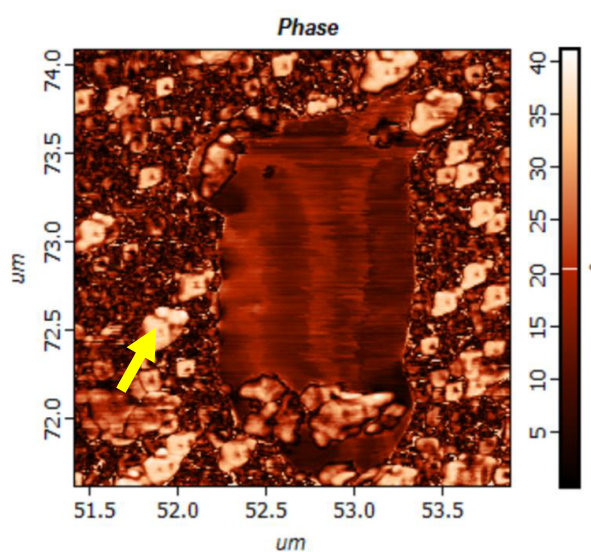


Figura 12. Análisis de fases al AFM de *M. bovis* obtenido por IMS. Diferencia de materiales en las protuberancias, probablemente

corresponden a la perlas inmunocargadas adheridas a la célula (flecha amarilla).

En la Figura 12 se muestra una imagen correspondiente al análisis de *M. bovis* (pared celular se observa en tono café oscuro) en presencia de las esferas (estructuras de tono más claro o brillante metálico) empleadas para la separación inmunomagnética (IMS), en esta imagen correspondiente al análisis de fase o composición de materiales se corrobora por la diferencia de tonos de la muestra, como algunas esferas están adheridas a la pared celular de *M. bovis* (flecha amarilla) y otras esferas se encuentran dispersas.

En la Figura 13 se muestra el análisis topológico de la célula *M. bovis* obtenida por separación inmunomagnética (IMS), observando un valor de altura de 203.4 nm,

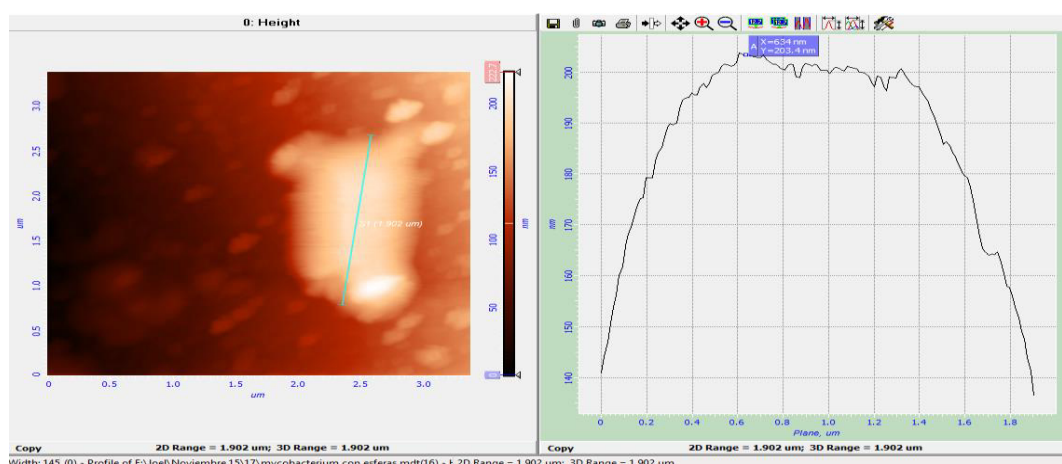


Figura 13.- Determinación de la altura de la célula de *M. bovis* sometidas a IMS.

Se compararon los parámetros morfométricos de la cepa de *M. bovis* sin recibir tratamiento, así como sometidas a descontaminación de Petroff y a IMS, los resultados se muestran en la Tabla 6 y Figura 14.

Tabla 6

Comparación de parámetros morfométricos de *M. bovis* sometida a distintos tratamientos.

Parámetros	Cultivo puro	Petroff	IMS
Largo (promedio en μm)	1.46	0.902	1.902
Altura (promedio en μm)	0.44	0.802	0.203

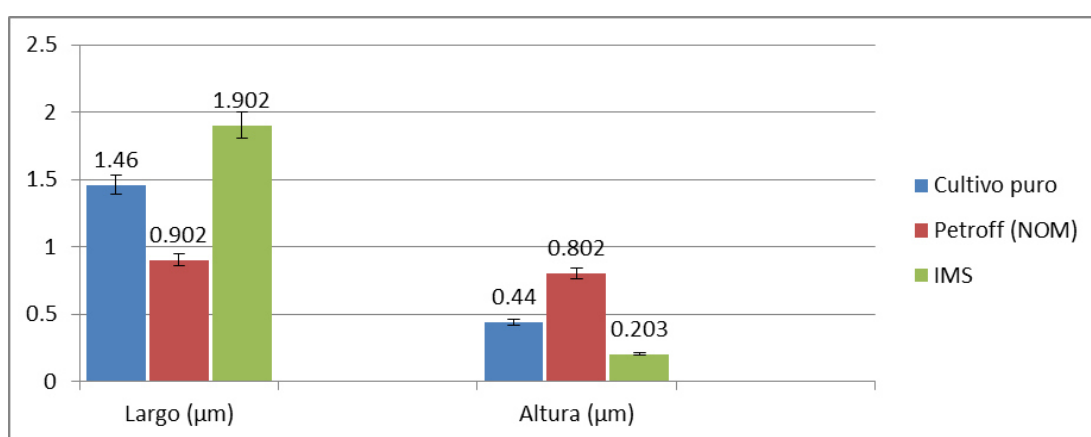


Figura 14.- Comparación de parámetros morfométricos de *M. bovis*. Se observa alteración morfométrica de la bacteria tanto al ser sometida al método de Petroff-NOM y al ser recuperada por el método de IMS.

Al analizar al MFA muestras de *M. bovis* sometidas a descontaminación por el método de Petroff-NOM y asiladas por el método de separación inmunomagnética (IMS), y medir las variables de altura y largo, se observa que ambos métodos de recuperación alteran la morfología de *M. bovis*, observando que *M. bovis* recuperada por el método de Petroff-NOM (barra roja) su longitud es menor y presenta mayor altura con respecto al control (barra azul) presentando diferencia significativa ($P \leq 0.05$), y el análisis de *M. bovis* obtenido por IMS presenta mayor longitud y disminuye su altura a la mitad con respecto a *M. bovis* control (barra azul) presentando diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

7.4 Correlación de identificación de Micobacterias por técnica histopatológica y aislamiento bacteriano.

Comprobada la diferencia en el porcentaje de recuperación entre los dos métodos de descontaminación se realizó un análisis global de las muestras ingresadas al laboratorio en el año 2015 y 2016 procesadas con el método de Petroff y Petroff/USDA respectivamente. Se observó un aumento en la correlación entre histopatología y aislamiento bacteriano en el año 2016 de un 41% respecto al año 2015 como se muestra en al Tabla 7.

Tabla 7

Correlación entre histopatología y aislamiento bacteriano en los años 2015 y 2016.

Período	Total de muestras	Aislamiento (ST)	<i>M. bovis</i>	Compatible Histopatología	Porcentaje		
					Aislamiento ST/ total de muestras	<i>M. bovis</i> / Aislamiento ST	Aislamiento ST/ Compatible HT
2015 Petroff	1907	80	59	635	4	74	13
2016 Petroff/USDA	844	226	101	420	27	45	54

En el año 2015 se evaluaron un total de 1,373 análisis, de los cuales 13 resultados fueron positivo tanto para aislamiento como histopatología, 3 muestras resultaron negativas a histopatología y fueron aislamiento positivas como se muestra en la Tabla 8. Se obtuvieron 986 muestras que fueron negativas por ambos métodos. Además, 371 muestras fueron histopatología positiva, pero el aislamiento fue negativo. El índice de concordancia Kappa entre histopatología y aislamiento fue de 0.0436, es decir una concordancia pobre.

Para el año 2016 se analizaron un total de 475 muestras de las cuales 108 muestras fueron positivas tanto por aislamiento como histopatología como se muestra en la Tabla 9. Se obtuvieron 135 muestras que fueron histopatología negativa con aislamiento positivo. El índice de concordancia kappa para el año 2016 fue de 0.239 es decir una concordancia débil.

7.5 descontaminantes distintos al NaOH

Al comparar suspensiones bacterianas al 0.5 en la escala de McFarland sometidas a proceso de descontaminación con NaOH, cloruro de benzalconio y cloruro de hexadecilpiridinio se obtuvo en promedio a la tercera semana de incubación con NaOH 10 colonias, con cloruro de benzalconio 17 colonias y con cloruro de hexadecilpiridinio 21 colonias.

Tabla 8

Análisis global de muestras procesadas en 2015 por el método de Petroff (NOM)

			Análisis de Aislamiento (ST)		
			POS	NEG	
Análisis histopatológico	POS		13	371	384
	NEG		3	986	989
			16	1357	1373
Sensibilidad	$a/(a+c)$	0.8125			
Especificidad	$d/(d+b)$	0.7266028			
PO	0.72760379				
PE	0.71518554				
INDICE KAPPA	0.04360119				
Valor de k	Fuerza de concordancia				
< 0.20	Pobre				
0.21 – 0.40	Débil				
0.41 – 0.60	Moderada				
0.61 – 0.80	Buena				
0.81 – 1.00	Muy buena				

Tabla 9

Análisis global de muestras procesadas en 2016 por el método de Petroff /USDA

			Análisis de Aislamiento		
Análisis histopatológico	POS		POS	NEG	
			108	135	243
	NEG		47	185	232
			155	320	475
Sensibilidad	a/(a+c)	0.69677419			
Especificidad	d/(d+b)	0.578125			
PO	0.61684211				
PE	0.49597784				
INDICE KAPPA	0.23979951				
Valor de k	Fuerza de concordancia				
< 0.20	Pobre				
0.21 – 0.40	Débil				
0.41 – 0.60	Moderada				
0.61 – 0.80	Buena				
0.81 – 1.00	Muy buena				

8. DISCUSIÓN

La finalidad de este estudio fue determinar que protocolo es mejor para el aislamiento de *M. bovis* a partir de muestras de origen bovino, considerando la descontaminación como una parte fundamental para el éxito en la recuperación de los bacilos.

Corner *et al.*, en 2012 consideran el NaOH como buen agente descontaminante, al usarlo en muestras de esputo y no encontrar diferencia significativa entre el uso de éste y otros agentes descontaminantes ni entre diferentes concentraciones de NaOH (2%, 0.75% y 0.075%). Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio con el uso de NaOH en muestras de nódulos linfáticos de bovinos indican que el tiempo que pasa en contacto la muestra con el NaOH así como la concentración de éste afecta severamente la viabilidad de los bacilos, pues al disminuir tanto el tiempo como la concentración del NaOH de 2N a 1N y el tiempo de 20 a 8 min obtuvo mayor porcentaje de recuperación de micobacterias. Las muestras utilizadas en este estudio provenían de animales de diferentes edades y estados de infección, por lo cual se trabajaron tanto tejidos paubacilares como tejidos con una mayor cantidad de bacilos, se debe considerar que la cantidad de bacilos viables contenidos en una muestra afectan directamente el éxito en el aislamiento (Andres L *et al.*, 2016).

Las muestras de tejido provenientes de diferentes estados de infección de animales bovinos, fueron procesadas con NaOH como parte del proceso de descontaminación, el primer grupo usó NaOH 2N y el segundo en una concentración de 1N lo cual mostró que al disminuir la concentración del NaOH se obtuvo mayor porcentaje de aislamientos. Se obtuvo un 38.4% de aislamientos de micobacterias del total de muestras compatibles por histopatología, diferenciándose del segundo grupo de muestras en las que la concentración fue menor (1N) y se obtuvo un 76.6% de aislamientos de micobacterias del total de muestras compatibles por histopatología, esto resulta concordante con los estudios de Torres P. *et al* en 2015 donde recomiendan usar NaOH 1N para no afectar la viabilidad de los bacilos.

El porcentaje de aislamientos de micobacterias atípicas en ambos grupos de muestras también presenta una diferencia significativa; mientras que en el primer grupo se aisló un 20% de micobacterias atípicas del total de muestras con crecimiento, en el segundo se aisló un 57% del total de muestras con crecimiento. El aislamiento de micobacterias atípicas superó el porcentaje de aislamientos de *M. bovis*, lo cual indica que la sensibilidad de la técnica aumenta al disminuir el tiempo de contacto y concentración del NaOH, pero no así su especificidad, sin embargo es importante identificar micobacterias atípicas para descartar falsos negativos al aislamiento de micobacterias en muestras que presenten lesión sugestiva e incluso a la tinción para identificar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en la histopatología.

Livingstone P *et al.*, en 2002 analizaron muestras de bovinos con lesión sugestiva a tuberculosis y aisló un 22.7% de micobacterias atípicas y lo considera un riesgo para la salud pública por los aislados de micobacterias atípicas que se han hecho en humanos en los últimos años, por lo cual consideramos importante poder aislar micobacterias atípicas en las muestras con lesión de las cuales no se obtiene *M. bovis*.

No existe un consenso general respecto al mejor método de descontaminar y cultivar micobacterias (Ayele W *et al.* 2015) pues en todos los protocolos donde se usen agentes químicos como descontaminantes afectan en cierto grado la viabilidad de los bacilos (Corner *et al.* 1995).

Observamos con microscopia de fuerza atómica la estructura de bacilos sometidos al proceso de descontaminación con NaOH 2N y observamos alteraciones en la pared celular, lo que sugieren daño celular en los bacilos imposibilitando o disminuyendo la posibilidad de recuperación en el cultivo. Se evaluaron células con inmunoseparación magnética y sin tratamiento alguno para observar la estructura de los bacilos sin exponerse a agentes químicos descontaminantes, en donde se observó la continuidad de la membrana y el mantenimiento del tamaño tanto en la cepa control como en la cepa sometida a IMS, contrastando con el tamaño ligeramente mayor (2 μ m) de las cepas descontaminadas con NaOH, lo cual sugiere que usar IMS es un método eficaz para aislar *M. bovis* sin comprometer su viabilidad tal como lo sugirió Stewart L *et al.*, 2014.

Se realizó PCR a las suspensiones bacterianas sometidas a IMS y se pudo amplificar desde la concentración más baja que probamos (10^2 UFC/ml) lo cual indica que usar PCR para confirmar la correcta inmunoseparación de *M. bovis* es una herramienta útil tal como lo afirma Stewart L. *et al* en 2013 cuando realizó PCR a suspensiones bacterianas y muestras de tejidos bovinos sometidos a IMS.

Considerando que en el año 2016 el procedimiento aplicado de descontaminación en la técnica de aislamiento fue el modificado comparado con el año 2015, se obtuvo una mayor concordancia entre histopatología y aislamiento. Además en el año 2015 se obtuvieron 13 muestras con resultados tanto positivo en aislamiento como en histopatología de un total de 1,373 análisis, es decir 0.95% en cambio para el año 2016 se obtuvieron 108 muestras con resultados positivos en ambos métodos de un total de 475 análisis, es decir 22.7%. Lo anterior nos indica que se mejoró sustancialmente el aislamiento he incluso se tuvieron 47 muestras que tuvieron histopatología negativa y aislamiento positivo comparado con 2015 que se tuvieron 3 muestras con histopatología negativa y aislamiento positivo lo que nos indicó un mayor número de muestras con aislamiento aunque la histopatología fuera negativa. Lo anterior obedece a que las muestras analizadas para histopatología y aislamiento por Petroff-NOM en la toma de muestra de rastro pudiera no dividirse el mismo tejido para ambos análisis.

Al compararse el promedio de colonias obtenidas sometidas a descontaminación con los distintos agentes descontaminantes se observó un mayor número de colonias con los agentes distintos al NaOH sin embargo los protocolos para usar estos agentes descontaminantes requieren periodos de incubación más prolongados por lo que no resultó práctico para poder trabajar muestras en grandes cantidades.

9. CONCLUSIONES

- Las muestras de nódulos linfáticos que se descontaminan con NaOH 2N tienen menor porcentaje de recuperación (Técnica Petroff-NOM).
- Existe mayor capacidad de recuperación en muestras que se descontaminan con NaOH 1N (Técnica Petroff/USDA).
- Utilizando separación inmunomagnética en suspensiones bacterianas es posible recuperar bacilos para ser observados por AFM.
- los bacilos sometidos a descontaminación presentan deformaciones en la pared celular.
- Al comparar las muestras analizadas durante 2015(Método de Petroff-NOM) y 2016 (Petroff-USDA) se observa un aumento en el porcentaje de aislamientos positivos al utilizar el método modificado (Petroff-USDA)
- Las técnicas de descontaminación distintas a las de la NOM tienen mayor porcentaje de recuperación
- El NaOH permite descontaminar muestras en menor tiempo.
- La IMS no rompe la pared celular de los bacilos.

10. PERSPECTIVAS

- Al quedar demostrado que distintos métodos de descontaminación pueden favorecer el aumento de aislamientos positivos, es importante seguir con la búsqueda de nuevos métodos de descontaminación y siembra en las muestras de tejido bovino.
- El uso de la IMS podría sustituir la descontaminación química y disminuir las tasas de contaminación, por lo cual ofrecería mucha información el realizar más experimentos con ella y comparándola con otros métodos de descontaminación.
- Dado que la AFM ayuda a observar alteraciones morfológicas en los bacilos podría indicar en que parte del proceso ocurren los mayores daños y con esto poder modificar los métodos de trabajo de tejidos bovinos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Artículos en revistas

Andrés F. Leal-Bohórquez, Claudia M. Castro-Osorio, Luz M. Wintaco-Martínez, Rafael Villalobos, Gloria M. Puerto-Castro. 2016. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in workers of bovine tuberculosis sanitation farms in Antioquia, Boyacá and Cundinamarca Rev. salud pública. 18 (5): 727-737.

Araujo CP. 2014. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. Brazilian Journal of Microbiology 45, 2, 633-640

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis 8: 924–937.

Baez-Saldana R, Villafuerte-Garcia A, Cruz-Hervert P, Delgado-Sanchez G, Ferreyra-Reyes L, Ferreira-Guerrero E, Mongua-Rodriguez N, Montero-Campos R, Melchor-Romero A, Garcia-Garcia L. 2015. Association between highly active antiretroviral therapy and type of infectious respiratory disease and All-cause in-hospital mortality in patients with HIV/AIDS: a case series. PLoS One. 2015;10:e0138115.

Barron MC, Nugent G, Cross ML. 2012. Importance and mitigation of the risk of spillback transmission of *Mycobacterium bovis* infection for eradication of bovine tuberculosis from wildlife in New Zealand. Epidemiology and Infection 141. 1394–406.

Barron MC, Tompkins DM, Ramsey DSL, Bosson MAJ. 2015. The role of multiple wildlife hosts in the persistence and spread of bovine tuberculosis in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal 63 (Suppl. 1), 68–76.

- Binning G, C.F. Quate, C. Gerber. 1986. Atomic force microscopy, Phys. Rev. Lett. 56 (1986) 930–933.
- Böddinghaus, Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. FEMS Microbiol. Lett. 65:171-176
- Buddle BM de Lisle GW, Griffin JFT, Hutchings SA.2015. Epidemiology, diagnostics, and management of bovine tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. New Zealand Veterinary Journal 63 (Suppl. 1), 19–27.
- Cano P. 2011. Bovine tuberculosis induces ectosome release in polymorphonuclear neutrophils. Tuberculosis. 90, 125-34
- Coleman JD, Livingstone PG.2000. Fewer Possums: Less Bovine Tb. In: Montague TL (ed). The Brushtail Possum: Biology, Impact and Management of an Introduced Marsupial. Pp 220–31.
- Corner LA, Nicolacopoulos C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. Aust Vet J.1988;65:202–205.19.
- Corner, L. A. 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology*. 303-312
- Corner, L. A., Barrett, R. H., Lepper, A. W., Lewis, V. & Pearson, C. W.1981. A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory. Australian Veterinary Journal 537-542
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, et al. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis 4: 59–70.

- Cousins, D. V., Corner, L. A., Tolson, J. W., Jones, S. L, Wood, P. R. 1998. Eradication of Bovine Tuberculosis from Australia. Key Management and Technical Aspects. 243-113
- Cousins, D. V, Roberts, J. L. 2001. Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis* 85. 5-15
- De la Rua Domenech. Infección por *Mycobacterium bovis* en el Reino Unido: Incidencia, riesgos, medidas de control y revisión de los aspectos zoonóticos de la tuberculosis bovina. *Tuberculosis (Ednib)* 2006 Mar; 86 (2): 77 - 109
- Ferroni A, Vu-Thien H, Lanotte P, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, et al. 2006. Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.*44:2237–9.
- Granje JM, 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol.* May;40(1-2):137-51
- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML. 2000. Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 87:775–9.
- Livingstone P, N Hancox, G Nugent, G Mackereth .SA Hutchings. 2015. Development of the New Zealand strategy for local eradication of tuberculosis from wildlife and livestock. *New Zealand Veterinary Journal* 63 (Supplement 1), 98–107.
- Marina de Azevedo Issaa, Paulo Martins Soares Filhoa, Antônio Augusto Fonseca Júniora, Mikael Arrais Hodona, Lílían Cristian dos Santosa, Jenner Karlisson Pimenta dos Reisb, Rômulo Cerqueira Leite. 2015. Microbiology Comparative study of *Mycobacterium bovis* primary isolation methods. *Brazilian Journal of Microbiology* 121:437-441

- Mitali Chatterjee, Susmita Bhattacharya, Kalpana Karak y Sujata G. Dastidar.2013. Effects of different methods of decontamination for successful cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. Indian J Med Res 138, 541-548.
- Mukesh S, Rabindra NM, Nageswari RG, Savita VJ, Kalpana A, Vivian W. 2012. Comparison of modified Petroff's and N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide methods for sputum decontamination in tertiary care hospital in India. Tuberculosis (Edinb).93:565–6.
- Muller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse C. .2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced Tuberculosis in Humans. Emerg Infect Dis 19:899–908.
- Olmos, D., González-Gaitano, G., & González-Benito, J. 2015. Effect of a silica nanofiller on the structure, dynamics and thermostability of LDPE in LDPE/silica nanocomposites. RSC Advances, 5(44), 34979-34984.
- Pedro Torres-Gonzalez, Miguel E. Cervera-Hernandez, Areli Martinez-Gamboa, Lourdes Garcia-Garcia, Luis P. Cruz-Hervert, Miriam Bobadilla-del Valle, Alfredo Ponce-de Leon, Jose Sifuentes-Osornio. 2015. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: a retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre. BMC Infectious Diseases. 16:657 DOI 10.1186/s12879-016-2001-5
- Robbe-Austerman S, Bravo DM, Harris B. Comparison of theMGIT 960 BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens.BMC Vet Res. 2013;9:72
- Rosso, G., Negreira, C., Sotelo, J. R., & Kun, A. 2012. Myelinating and demyelinating phenotype of Trembler- J mouse (a model of Charcot–Marie–Tooth human disease) analyzed by atomic force microscopy and confocal microscopy. Journal of Molecular Recognition, 25(5), 247-255.
- Samra Z, Kaufman L, Bechor J, Bahar J. 2000. Comparative study of three culture systems for optimal recovery of mycobacteria from different clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 19:750–4.

Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR (2013) Improved Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in Bovine Lymph Node Tissue Using Immunomagnetic Separation (IMS)-Based Methods. PLoS ONE 8(3): e58374. doi:10.1371

Torgerson PR, Torgerson DJ .2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? Trends Microbiol 18: 67–72

Electrónico

Center Food Security and Public Healt. 2009. Tuberculosis bovina (Online) disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovinetuberculosis-es.pdf>

Office International des Epizooties. Bovine tuberculosis. (Online) disponible en: https://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Plan de erradicacion de la tuberculosis bovina. (Online) disponible en: http://www.cnog.org.mx/archivos/expo/SAGARPA_SENASICA%20Regionalizacio%CC%81n%20en%20Tuberculosis%20Bovina%20.pdf

Secretaria de Ganaderia, Desarrollo rural, Pesca y aleimntacion. Norma oficial Mexicana contra la tuberculsois bovina. (Online) disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4874790&fecha=08/03/1996

Secretaria de ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Aliemntación. Norma oficial Mexicana de criteriso de operación de laboratorios aprobados en diagnsotico de salud animal. (Online) disponible en: <http://sagarpa.gob.mx/normateca/normateca2/SENASICA%20NORM%2079.pdf>

RESUMEN BIOGRÁFICO

Joel Delgadillo Medrano

Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis: Evaluación de técnicas bacteriológicas para el aislamiento de *Mycobacterium bovis* en tejidos bovinos

Campo de estudio: Diagnostico microbiológico

Educación: Egresado de la facultad de ciencias agropecuarias del Centro de Estudios Universitarios, grado obtenido de Médico Veterinario y Zootecnista.

Experiencia Profesional: Analista responsable de bacteriología desde 2011,
Profesor de parasitología y microbiología desde 2015